



FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

“Péptidos víricos de unión a motores microtubulares y su  
aplicación para la generación de nanopartículas como  
herramientas de internalización celular”

**TESIS DOCTORAL**

Inmaculada Dalmau Mena

2013



**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

“Péptidos víricos de unión a motores microtubulares y su aplicación para la generación de nanopartículas como herramientas de internalización celular”

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias por:

Inmaculada Dalmau Mena

(Licenciada en Biología)

**Directora de la Tesis:**

Dra. Covadonga Alonso Martí

**Tutor de la Tesis:**

Manuel Soto Álvarez

El presente trabajo ha sido realizado en el **Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA)** y financiado por el proyecto AGL2009-09209

Madrid, 2013



# INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS PARA LA AUTORIZACIÓN DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL

*(Doctoral Thesis Supervisor's report to dissertation authorization)*

(En el caso de existir más de un director de la tesis doctoral, deberá presentarse un informe de cada uno de los co-directores)

*(In case of more than one Thesis Supervisor, a report of each one must be submitted)*

D/D<sup>a</sup> COVADONGA ALONSO MARTÍ.....  
*(Thesis Supervisor's name and surname)*

Director/a de la tesis doctoral de D/D<sup>a</sup> INMACULADA DALMAU MENA.....  
*(PhD Candidate's name and surname)*

**informa favorablemente** la solicitud de autorización de defensa de la tesis doctoral con el

Título *(Title of the PhD Dissertation)*: Péptidos víricos de unión a motores microtubulares y su aplicación para la generación de nanopartículas como herramientas de internalización celular.

.....,

presentada por dicho/a doctorando/a.

*(favorably reports on the application for dissertation authorization submitted for the PhD Candidate)*

**Programa de Doctorado** *(Doctoral program)*: RD 1393/2007

**La tesis está sometida a procesos de confidencialidad:** SÍ ☐ NO ☒

*(Thesis is under confidentiality procedures: Yes / No)*

**La tesis se presenta como compendio de publicaciones:** SÍ ☐ NO ☒

*(Thesis is submitted as a compendium of publications: Yes / No)*

## **Resultados y valoración (Results and assessment):**

### **ANTECEDENTES DE LA CUESTIÓN Y OBJETIVOS PROPUESTOS**

#### ***(Background of the field and main goals)***

*Los antecedentes de la cuestión están bien presentados y estructurados y revelan un amplio conocimiento de la literatura del doctorando. Además, son muy informativos sobre el estado de la cuestión de los temas tratados, dado que es un abordaje multidisciplinar que requiere introducir los diversos campos científico que se abordan, por un lado los péptidos de origen vírico de unión a dineína y su interacción con el sistema de transporte ligado a microtúbulos y, por otro el estado de la cuestión en el tema de entrega o “delivery” de fármacos y terapia génica y desarrollo de nanopartículas funcionalizadas para transporte intracelular usando dichos péptidos. Los objetivos son por tanto ambiciosos y de gran repercusión, están bien enfocados y abordan el problema de estudio de forma directa y apropiada.*

### **DESARROLLO DEL TRABAJO Y METODOLOGÍA**

#### ***(Procedure and Development of the general matter and methodology)***

*El doctorando ha realizado un trabajo brillante, ordenado y minucioso demostrando gran capacidad de trabajo e iniciativa. La metodología es apropiada y rigurosa. La memoria está bien redactada y ordenada de forma sistemática y comprensiva. Los resultados son relevantes y novedosos abordando cuestiones aun no bien clarificadas sobre el sistema de transporte intracelular ligado a motores moleculares, el papel respectivo del citoesqueleto de actina y los microtúbulos en concierto con los endosomas, y la formación de conexiones intercelulares, proyecciones y nanotubos. Además, propone un papel para las proteínas víricas de unión a dineína no solo en el transporte intracelular y la diseminación de los virus de célula a célula, sino además en la reorganización de la envuelta nuclear de relevancia tanto en las infecciones víricas per se, como en las posibles aplicaciones biotecnológicas de estos péptidos.*

### **APORTACIONES DE CARÁCTER GENÉRICO O EXPERIMENTAL**

#### ***(Contribution to the experimental and general field)***

*Los resultados de esta tesis doctoral son importantes desde el punto de vista de la ciencia básica en lo que se refiere al desarrollo de herramientas para el estudio del transporte mediado por los motores microtubulares. Desde el punto de vista básico aborda de una forma original las bases de constitución de nanotubos y conexiones intercelulares y la mecánica de reorganización de la envuelta nuclear por la dineína. Al mismo tiempo supone un avance de aplicación inmediata para el desarrollo de nanopartículas funcionalizadas con péptidos de unión a dineína de uso potencial en terapia génica y entrega de fármacos.*



*a mi família,*  
*especialmente a Cris.*

*a Ike*





## **Agradecimientos**

*En 2010, empecé a trabajar en el INIA para realizar esta tesis doctoral y recuerdo perfectamente lo lejos que quedaba entonces este día. Aún ahora me cuesta creer que este momento haya llegado a su fin. Esta ha sido una etapa en la que he aprendido muchas cosas y he conocido mucha gente simpática e interesante aquí en Madrid, una ciudad llevada por el caos y el abundante tráfico pero con unas calles, bares y gente que te hacen sentir como en casa. Todas las experiencias acumuladas en este periodo la hacen sin duda una etapa para recordar. Me gustaría aprovechar esta sección para recordar a todos aquellos que han estado a mi lado ayudándome desde el principio hasta el final haciendo posible de alguna manera que haya llegado hasta aquí.*

*En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Covadonga Alonso que me brindara la oportunidad de realizar una tesis en su laboratorio. Gracias por el buen trato que siempre me has dispensado, por haber depositado tu confianza en mí, por tu ayuda, tu paciencia y tu preocupación. Además quería agradecerte así como al Dr. José Ángel Escribano vuestra confianza al haberme permitido formar parte del grupo de ALGENEX S.L. durante un periodo de tiempo que me ayudó a completar mis conocimientos junto con los de esta tesis que sin duda me serán de gran utilidad en el futuro. Me gustaría agradecer también al Dr. Soto la tutela de esta tesis y la rapidez con la que la leyó y evaluó. Quería agradecer especialmente al Dr. De la Fuente y al Dr. Del Pino por su colaboración en el proyecto de esta tesis doctoral, su ayuda incalculable, sus grandes ideas y por último su gran simpatía. Ha sido un auténtico placer trabajar con vosotros.*

*Me gustaría también aprovechar este espacio para agradecer a mis compañeros de laboratorio de los cuales he aprendido todo y los que han hecho que mi día a día fuese siempre muy agradable y divertido y con los que me he sentido desde el principio en familia. En primer lugar, a Bruno y a Inma que siempre han estado*

*ahí para enseñarme todas las técnicas del laboratorio y para cualquier duda que me haya surgido. A Marta y Miguel Ángel que desde el principio también estuvieron conmigo enseñándome a utilizar las líneas celulares y a hacer transfecciones y a Raquel que empezó al mismo tiempo que yo y que ha estado siempre apoyándome. Con todas las horas que hemos pasado todos juntos era inevitable que acabásemos con un montón de anécdotas que contar... y me quedo con unos recuerdos inmejorables de las mil risas que nos hemos echado. Gracias por vuestra amistad y por haberme dado ánimos y consejos siempre que lo he necesitado. Sin vuestra presencia en el laboratorio, nada hubiera sido igual. Se os echa de menos.*

*También me gustaría agradecer a los miembros del grupo de ALGENEX S.L. los cuales siempre han estado ahí para ayudarme en todo momento y para hacer de las horas de comer un momento muy agradable. Muchas gracias Eva, Silvia, Javi, Carmen, Susana, Edel, Miguel, Miguel A. y Manuel. Por último, a la gente del departamento de Biotecnología como María, Ana, Ana Handler y Estela y con la que, en compañía de mis compañeros de laboratorio, he compartido las horas de comida en la cafetería haciendo de ese momento uno de los mejores momentos del día en la que la risa estaba asegurada. En general, en algún momento, todos los miembros del departamento me han brindado su ayuda y consejos y por eso les doy mil gracias a todos!*

*Además, me gustaría agradecer especialmente a todos mis amigos que siempre han estado ahí, vivan lejos o cerca, para aconsejarme, animarme y hacerme reír cuando más lo necesitaba... ¡Muchas gracias!*

*Por último, me gustaría agradecer muy especialmente a mi familia que siempre ha estado apoyándome y mandándome muchos ánimos y energía positiva desde Mérida y*

*Denia y a Ike que siempre ha estado a mi lado soportando mi estrés y haciendo que los malos momentos sean menos malos y los buenos aún mejores.*

*¡Muchas gracias a todos!*



## Índice

<b>ABREVIATURAS</b>	23
<b>ABSTRACT</b>	28
<b>RESUMEN</b>	31
<b>INTRODUCCIÓN</b>	34
1. PAPEL DEL CITOESQUELETO EN EL TRANSPORTE INTRA- E INTERCELULAR DE VIRUS Y PEPTIDOS VIRALES	35
1.1. Composición del citoesqueleto y mecanismo de transporte asociado	35
1.2. Conexiones celulares	40
1.3. El papel de la dineína en el transporte intra- e intercelular de DBPs	42
2. VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA): VIRUS Y PROTEINAS VIRALES INVOLUCRADAS EN EL TRANSPORTE INTRACELULAR	45
2.1. Péptidos derivados del vppa con capacidad de penetración celular	47
3. SISTEMA DE REPARTO CELULAR CON NANOPARTÍCULAS DE ORO (NPs) FUNCIONALIZADAS CON DBPs	48
3.1. NPs funcionalizadas con DBPs sintetizados a través de secuencias de vppa	49
<b>OBJETIVOS</b>	52
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	55
1. CULTIVOS CELULARES	56
2. DISEÑO DE PÉPTIDOS E INCUBACIONES	57
2.1. Diseño de péptidos	57
2.2. Incubación de péptidos en células	58
3. SINTESIS DE NANOPARTICULAS (NPs) Y CARACTERIZACIÓN	58
3.1. Compuestos químicos para la síntesis de nanopartículas	58
3.2. Caracterización	59
3.3. Au@tiopronina	59
3.4. Au@Tio@DBPs	60
3.5. Au <sub>14</sub> @DBPs	60
3.6. Incubación de nanopartículas en células	62
4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	62
4.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	62
4.2. Western Blot	64
5. MICROSCOPIA	64
5.1. Microscopía de fluorescencia convencional	64



5.2. Microscopía Confocal.....	65
6. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	65
6.1. Cepas bacterianas.....	65
6.2. Transformación de cepas bacterianas.....	65
6.3. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	66
6.4. Transfección de células Vero.....	66
7. ANÁLISIS DE CITOTOXICIDAD Y USO DE INHIBIDORES.....	67
8. CUANTIFICACIÓN DE FLUORESCENCIA.....	68
9. CUANTIFICACIÓN DE NANOTUBOS.....	68
10. ANÁLISIS DE DATOS.....	68
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
1. DISEÑO DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS CON CAPACIDAD DE ENTRADA EN LA CÉLULA.....	71
1.1. Diseño de péptidos que unen dineína (DBPs) y estudio de su penetración celular.....	71
1.1.1. Captación celular y distribución de los péptidos en el interior celular.....	72
1.2. Transporte intracelular y transporte de célula a célula de los péptidos.....	74
1.2.1. Movimiento y acumulación en proyecciones celulares y nanotubos.....	74
1.3. Movimiento de los péptidos en diferentes líneas celulares.....	75
1.3.1. Polarización celular y su relación con el transporte.....	77
1.3.2. Colocalización de los péptidos con marcadores del citoesqueleto.....	78
2. TRANSPORTE CÉLULA-CÉLULA DE PÉPTIDOS A TRAVÉS DE NANOTUBOS.....	79
2.1. Dinámica temporal de la formación de proyecciones celulares.....	80
2.2. Transporte de los péptidos bajo el efecto de agentes perturbadores del citoesqueleto.....	81
2.2.1.Efecto del Nocodazol en el movimiento de los péptidos.....	81
2.2.2.Efecto del Taxol en el movimiento de los péptidos.....	81
2.2.3.Efecto de drogas despolimerizantes de actina en el movimiento de los péptidos.....	82
2.2.4.Efecto del EGTA en el movimiento de los péptidos.....	82
3. TRANSPORTE AL NÚCLEO. CAPACIDAD DE LOS PÉPTIDOS DE ATRAVESAR LA ENVOLTURA NUCLEAR.....	85

3.1. Capacidad de DBPs para atravesar la lámina nuclear. ....	85
3.2. Los DBPs alcanzan el nucléolo celular.....	86
4. ENDOSOMAS Y TRANSPORTE DE LOS PÉPTIDOS.....	87
4.1. Entrada dependiente de energía y pH.....	87
4.2. Colocalización con endosomas tardíos y cuerpos multivesiculares (MVBs)....	87
5. DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON PÉPTIDOS CON CAPACIDAD DE UNION A DINEÍNA.....	90
5.1. Síntesis de nanopartículas Au@Tiopronina (2nm).....	90
5.1.1 Funcionalización de Au@tiopronina mediante Química de Carbodiimida.....	91
5.2. Síntesis de nanopartículas Au14@PEG (14nm).....	92
5.2.1 Funcionalización de Au14@PEG mediante Química de Carbodiimida....	93
6. INTERNALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS Y SUS PROPIEDADES DINAMICAS.....	94
6.1 Captación celular de las NPs.....	94
6.2. Propiedades dinámicas de las nanopartículas (NPs).....	97
6.3. Transporte de las nanopartículas dependiente de microtúbulos.....	97
6.3.1.Efecto del Nocodazol en el movimiento de las nanopartículas.....	99
6.3.2.Efecto de la Latrunculina A en el movimiento de las nanopartículas.....	99
6.4. Transporte eficiente de los DBPs y las nanopartículas Au@Tio@DBPs hacia el interior del núcleo.....	101
6.4.1.NPs dejan una huella a su entrada al núcleo.....	101
6.4.2.Plegamiento reversible de las láminas nucleares.....	101
6.4.3.Similitud con las propiedades dinámicas de los DBPs.....	101
6.5. Transporte de proteínas unidas a las NPs funcionalizadas.....	101
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>106</b>
1. LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE LOS DBPs Y SUS PROPIEDADES DINÁMICAS.....	107
2. IMPLICACION DEL CITOESQUELETO Y ENDOCITOSIS EN EL TRANSPORTE DE LOS DBPs. ....	108
3. FUNCIONALIZACIÓN DE NPs DE ORO CON DBPs PARA SU POTENCIAL USO EN EL REPARTO CELULAR.....	113
4. TRANSPORTE INTRA E INTERCELULAR DE NPs.....	116

4. ENTRADA NUCLEO DE DBPs Y NPs.....	117
5. NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON DBPs SON BUENAS CANDIDATAS PARA LA LIBERACIÓN INTRACELULAR DE SUSTANCIAS.....	120
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>122</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>125</b>



## **Abreviaturas**

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Antp-TPR:</b>	Péptido híbrido diseñado a partir de la interfaz de unión entre la chaperona molecular de Hsp90 y el dominio de Hop TPR2A
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm:</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>Arp-1:</b>	Proteína relacionada con la actina 1
<b>ATCC:</b>	Colección Americana de Cultivos Tipo
<b>ATP:</b>	Adenosín trifosfato
<b>Au@DBPs:</b>	Nanopartículas de 13 nm con núcleo de oro funcionalizadas con DBPs
<b>Au@DynPro:</b>	Nanopartículas de 13 nm con núcleo de oro funcionalizadas con DynPro
<b>Au@ShortPro:</b>	Nanopartículas de 13 nm con núcleo de oro funcionalizadas con ShortPro
<b>Au@TransMy:</b>	Nanopartículas de 13 nm con núcleo de oro funcionalizadas con TransMy
<b>Au@TransRb:</b>	Nanopartículas de 13 nm con núcleo de oro funcionalizadas con TransRb
<b>Au@Tiopronina:</b>	Nanopartículas de 2 nm con núcleo de oro
<b>Au@Tio@DBPs:</b>	Nanopartículas de 2 nm con núcleo de oro y funcionalizadas con DBPs
<b>Au@Tio@DynPro:</b>	Nanopartículas de 2 nm con núcleo de oro y funcionalizadas con DynPro
<b>Au@Tio@DynPro-M2:</b>	Nanopartículas de 2 nm con núcleo de oro, funcionalizadas con DynPro y conteniendo la proteína M2 de Influenza
<b>Au@Tio@ShortPro:</b>	Nanopartículas de 2 nm con núcleo de oro y funcionalizadas con ShortPro
<b>Au@Tio@TransMy:</b>	Nanopartículas de 2 nm con núcleo de oro y funcionalizadas con TransMy
<b>Au@Tio@TransRb:</b>	Nanopartículas de 2 nm con núcleo de oro y funcionalizadas con TransRb
<b>BSA:</b>	Seroalbúmina bovina
<b>CCL:</b>	Número de catálogo de línea celular
<b>CD155:</b>	Receptor humano de poliovirus
<b>CD63:</b>	Marcador de cuerpos multivesiculares
<b>COS-7:</b>	Línea celular similar a fibroblastos (ATCC CRL-1651)
<b>CPP:</b>	Péptido con capacidad de penetración celular
<b>CRL:</b>	Línea de almacén celular
<b>CV-1:</b>	Línea celular de riñón de mono similar a fibroblastos (ATCC CCL-7)
<b>DBP:</b>	Péptidos de unión a dineína
<b>DH5α:</b>	Cepa de <i>E. coli</i>
<b>DLC8:</b>	Cadena ligera de 8 kDa de la dineína citoplasmática, DYNLL1
<b>DMEM:</b>	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
<b>DYNC1H1:</b>	Cadena intermedia 1 de la dineína citoplasmática 1
<b>DYNLL:</b>	Cadena ligera de 8 KDa de la dineína citoplasmática
<b>DYNLT1:</b>	Cadena ligera de la dineína citoplasmática tctex 1
<b>DynPro:</b>	<i>Dynein Propelled</i> . Péptido cuya secuencia se deriva de la p54 de VPPA
<b>E. coli:</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDC:</b>	N-(3-Dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida hidrocloreuro
<b>EDTA:</b>	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
<b>EGFP:</b>	Proteína verde fluorescente mejorada
<b>EGTA:</b>	Ácido etilenglicol tetracético
<b>ELISA:</b>	Ensayo inmunoabsorbente enzimático
<b>EMEM:</b>	Medio mínimo esencial de Eagle
<b>FITC:</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GAG:</b>	Gen codificante de proteínas estructurales en retrovirus
<b>GFP:</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GTPasa:</b>	Trifosfatasa de guanosina
<b>HC:</b>	Cadena pesada
<b>HCMV:</b>	Citomegalovirus humano
<b>HEK 293T/17:</b>	Línea celular renal embrionaria humana (ATCC CRL-11268)
<b>Hela:</b>	Línea celular derivada de cáncer cérvico-uterino (ATCC CCL-2)

<b>HRP:</b>	Peroxidasa de rabano picante
<b>HSV:</b>	Virus del Herpes simplex
<b>IC:</b>	Cadena intermedia
<b>IF:</b>	Inmunofluorescencia
<b>IFI:</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IntCt:</b>	Control interno basado en una secuencia aleatoria de aminoácidos
<b>kDa:</b>	Kilodalton
<b>Kpb:</b>	Kilopares de bases
<b>LB:</b>	Luria-Bertani
<b>LBR:</b>	Receptor de lámina B1
<b>LC8:</b>	Cadena ligera de la dineína de 8KDa
<b>LC7:</b>	Cadena ligera de la dineína de 7KDa
<b>LIC:</b>	Cadena intermedia ligera
<b>MDCK:</b>	Células de riñón caninas de Madin-Darby (ATCC CCL-34)
<b>MEM:</b>	Medio de Eagle modificado
<b>MES:</b>	Ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico
<b>MFI:</b>	Intensidad de fluorescencia media
<b>mQ:</b>	Milli-Q. Se refiere a agua ultra pura, de grado de laboratorio, que ha sido filtrada y purificada por ósmosis inversa
<b>MS:</b>	Espectroscopía de masas
<b>MTOC:</b>	Centro organizador de microtúbulos
<b>MVBs</b>	Cuerpos multivesiculares
<b>MWCO:</b>	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
<b>ND:</b>	No determinado
<b>NDEL:</b>	Nombre alternativo para la proteína NUDEL
<b>NLS:</b>	Señal de localización nuclear
<b>NP:</b>	Nanopartícula en general englobando las de 2 nm y las de 13 nm
<b>NUDE:</b>	Proteína nuclear E de distribución
<b>NUDEL :</b>	<i>NUDE-like</i>
<b>pb:</b>	Pares de bases
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino
<b>PEG:</b>	Polietilenglicol
<b>PiPSCs:</b>	Células madre pluripotentes inducidas por proteína
<b>PPA:</b>	Peste Porcina Africana
<b>PrPSc:</b>	Proteína priónica en forma <i>Scrapie</i>
<b>PtdIns(3,5)P2:</b>	Fosfatidilinositol 3, 5-bifosfato
<b>PtdIns3P:</b>	Fosfatidilinositol 3-fosfato
<b>p30:</b>	Fosfoproteína temprana de VPPA
<b>p72:</b>	Proteína principal de la cápsida de VPPA
<b>Rab 7:</b>	Pequeña GTPasa localizada en el compartimento endosomal tardío
<b>Rp3:</b>	Cadena ligera de la dineína del virus Herpes simplex
<b>SBF:</b>	Suero bovino fetal
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SDS-PAGE:</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>Sf21:</b>	Células de ovario aisladas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (IPLB-Sf21-AE)
<b>SK-N-MC:</b>	Línea celular de neuroblastoma humano (ATCC HTB-10)
<b>ShortPro:</b>	Péptido cuya secuencia se deriva de la p54 de VPPA pero acortada conteniendo los aa críticos para la unión a dineína

<b>SPB:</b>	Banda de plasmones de superficie
<b>SV-40:</b>	Virus 40 vacuolado del simio (poliomavirus)
<b>Sulfo NHS:</b>	N-hidroxisulfosuccinimida
<b>TAMRA:</b>	Tetrametilrodamina
<b>Tat:</b>	Trans-activador de la transcripción de VIH
<b>Tctex1:</b>	Brazo interno flagelar de la cadena ligera de la dineína
<b>TEM</b>	Microscopia electrónica de transmisión
<b>Tio:</b>	Tiopronina
<b>+TIPs:</b>	Proteínas direccionadoras a los extremos positivos
<b>TNM-FH:</b>	Medio de cultivo para células de insecto derivadas de <i>Trichoplusia ni</i>
<b>Tn5:</b>	Celulas High Five™, que son un aislado clonal derivado de la línea celular parental de <i>Trichoplusia ni</i> (BTI-TN-5B1-4)
<b>TransMy:</b>	Péptido cuya secuencia se deriva de la p54 de VPPA pero contiene un dominio de la miosina
<b>TransRb</b>	Péptido cuya secuencia se deriva de la p54 de VPPA pero contiene un dominio de VR
<b>TRIS:</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>UL34:</b>	Proteína de membrana tipo dos del virus Herpes simplex 1
<b>US11:</b>	Proteína de unión a ARN del virus Herpes simplex 1
<b>UV/VIS:</b>	Espectroscopía ultravioleta-visible
<b>VIH:</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
<b>VPPA:</b>	Virus de la Peste Porcina Africana
<b>VR:</b>	Virus de la Rabia
<b>VRS:</b>	Virus Respiratorio Sincitial
<b>VV:</b>	Virus Vaccinia
<b>WGA:</b>	Aglutinina de germen de trigo
<b>WB:</b>	Western Blot





## **Abstract**

In this thesis we describe the design of peptide sequences with a binding capacity to dynein as shown by nuclear magnetic resonance. Dynein is a microtubule motor protein and by means of direct binding to this protein, these peptide sequences interact with microtubules and exhibit intracellular movement and intercellular travelling through cellular projections. These studies were performed with viral- (ASFV and RV) and cellular- (Myosin V) dynein binding peptides labelled with a fluorochrome and modified with a poly-arginine tail to facilitate cell penetration. We show that these peptides enter the cell by endocytosis and their motion is dependent on the intracellular microtubules. Using live-cell imaging we have been able to demonstrate that these dynein-binding peptides have novel dynamic properties and travel through the cytosol reaching the nucleus, accumulating in the MTOC area. Moreover, these peptides show the capacity of shuffle the nucleus and nucleolus regularly. Additionally, we show that these peptides have the ability to accumulate in the cell cortex promoting the formation of projections, which increase the efficiency of intercellular transport. These projections can be lamellipodia, filopodia, actin nanotubes, or wider nanotubes with progressively acetylated tubulin cytoskeleton forming stable cell connections progressively. As a result of our observations we suggest a mechanism that involves both actin and tubulin in the formation of nanotubes and the dynamic forces that are generated by cooperative action of endosomes microtubules and polarized dynein. As a consequence of the above-mentioned properties, these peptides have been used to functionalize gold nanoparticles in order to use them as molecular carriers as an application. We have developed these functionalized nanoparticles and their properties have been analysed. Functionalized nanoparticles are efficiently internalized into the cells and rapidly dispersed in the cytoplasm and cellular projections reaching and penetrating the nucleus. This ability of being propelled and shuttle the nucleus by molecular motor dynein could overcome the current limitations of gene therapy to reach this isolated cell compartment. This feature, coupled with the ability of these functionalized nanoparticles to disperse to neighbouring cells, thus increasing the cell retention and avoiding losses and allowing the use of lower doses, would make them good candidate molecular carriers for drug delivery in cell therapy.



## **Resumen**

Esta tesis doctoral trata del diseño y estudio de secuencias peptídicas con capacidad de unión a la dineína. La dineína es una proteína motora microtubular a través de cuya unión estos péptidos interaccionan con los microtúbulos y adquieren propiedades dinámicas. Usando microscopía de células vivas a tiempo real pudimos determinar que se trata de un movimiento activo intracelular bidireccional en células polarizadas. También se observó que dichas secuencias se transportan a través de proyecciones celulares de una célula a otra. Estos estudios fueron llevados a cabo con péptidos de unión a dineína de origen viral (VPPA y VR) y celular (Miosina V), marcados con un fluorocromo y modificados con una cola de poliarginina para facilitar su penetración celular. Nuestros resultados demuestran que el movimiento celular de dichos péptidos es dependiente de microtúbulos. Los péptidos muestran propiedades dinámicas novedosas y son capaces de moverse a través del citosol acumulándose en la zona del MTOC en células no polarizadas. En células polarizadas el movimiento de los péptidos sigue la dirección de los microtúbulos hacia el frente de movimiento. Además, tienen la capacidad de penetrar en el núcleo y alcanzar el nucléolo moviéndose en trayectos cortos y regulares. Dichos péptidos tienen la capacidad de acumularse en la corteza celular promoviendo la formación de proyecciones celulares que aumentan la eficacia del transporte intercelular y que pueden aparecer en forma de lamelipodios, filopodios, finos nanotubos de actina e incluso nanotubos más anchos con citoesqueleto de tubulina. Estos evolucionaban a lo largo del tiempo formando conexiones celulares estables enriquecidas en tubulina acetilada. Así pues, se ha propuesto un mecanismo que implica tanto actina como tubulina en la formación de nanotubos y en las fuerzas dinámicas que se generan por acción cooperativa de ambas proteínas en los microtúbulos polarizados. Se han desarrollado sistemas de transporte intracelular con nanopartículas funcionalizadas con estos péptidos para conferirles capacidad de unión al sistema de transporte microtubular. Así, las nanopartículas de oro funcionalizadas podrían ser utilizadas para actuar como transportadores de moléculas en terapia celular. Estas nanopartículas son eficientemente internalizadas en las células y se dispersan rápidamente en el citoplasma celular y proyecciones celulares llegando a alcanzar el núcleo. Así pues se podrían superar las limitaciones presentes de la terapia génica para alcanzar este compartimento celular aislado por la membrana nuclear. Además, la capacidad de estas nanopartículas funcionalizadas de dispersarse por el cultivo, permitiría el uso de dosis más bajas del fármaco a transportar y hacen de dichas nanopartículas buenas candidatas para la entrega intracelular de fármacos.



## **Introducción**



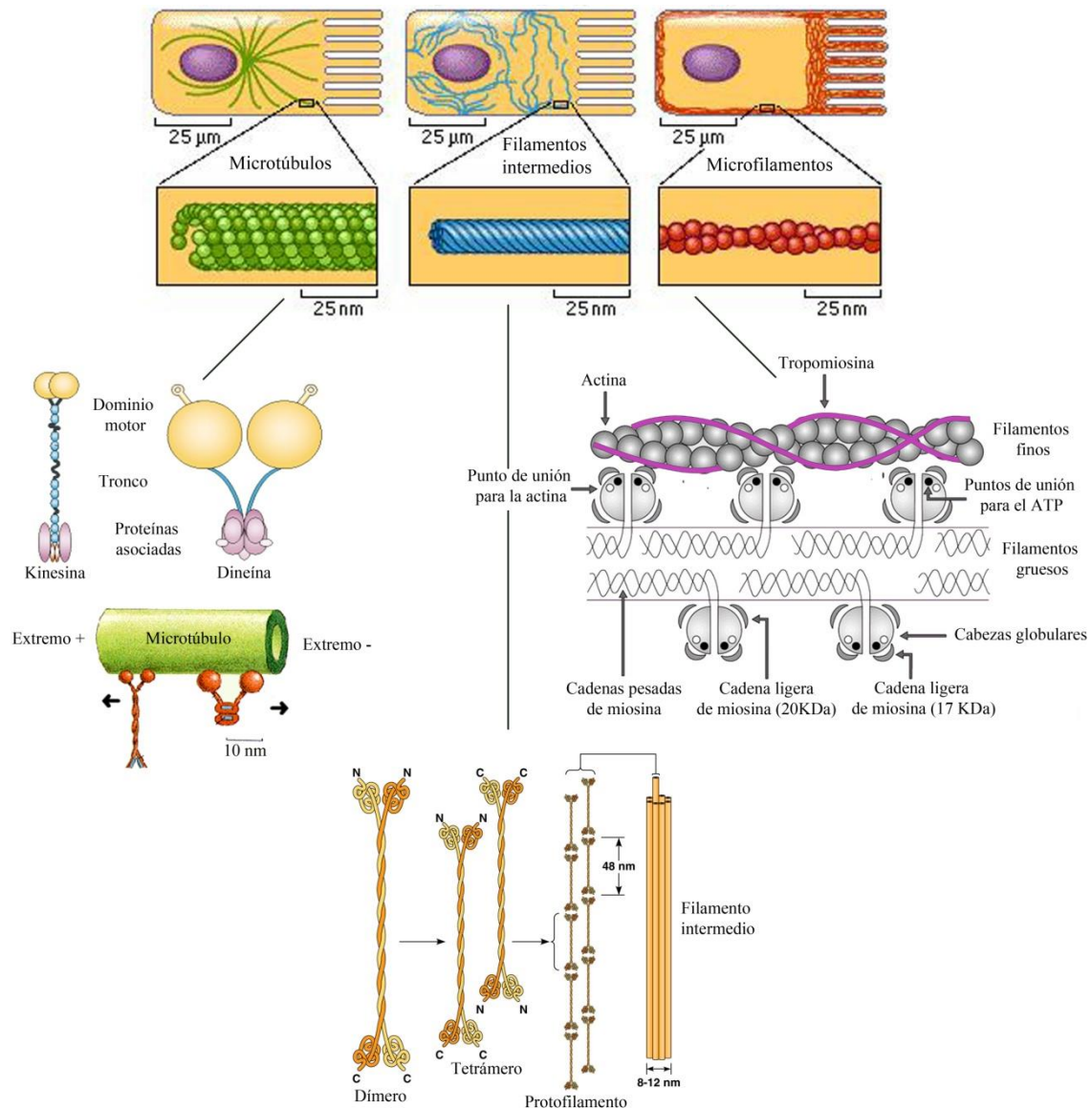
## **1. PAPEL DEL CITOESQUELETO EN EL TRANSPORTE INTRA- E INTERCELULAR DE VIRUS Y PEPTIDOS VIRALES.**

Los virus son parásitos intracelulares obligados y, como tales, dependen de la maquinaria de las células que infectan para generar su progenie viral. El ciclo infeccioso de los virus se divide generalmente en las siguientes etapas: adsorción del virión a receptores de la membrana plasmática de la célula; penetración en la célula, ya sea por endocitosis o por fusión de la envuelta del virión y de la membrana plasmática; transporte del virión desde la periferia de la célula hasta su lugar de replicación, que puede ser en el citoplasma o en el núcleo; replicación del genoma y síntesis de las proteínas virales; ensamblaje del genoma y las proteínas víricas para generar los nuevos viriones; transporte de los viriones a la periferia de la célula y/o lisis de la célula para salir de ella e infectar nuevas células (Knipe and Cliffe, 2008; Tao and Ren, 2013). El citoesqueleto es el responsable de mantener la arquitectura de las células, permitir la migración celular, la mitosis y también el transporte intra- e intercelular de los orgánulos citoplásmicos, los ARNm, proteínas y demás componentes celulares. No es de extrañar entonces que prácticamente todos los virus dependan de él en alguna o todas las etapas enumeradas anteriormente. Los virus han desarrollado diversas estrategias para hacerse con el control del citoesqueleto y explotarlo en beneficio propio (Dohner and Sodeik, 2005; Matthews et al., 2013; Radtke et al., 2006) . Durante el proceso de entrada de los virus en las células, el citoesqueleto se convierte en el protagonista absoluto. Sin su participación, los virus, cuyo diámetro puede ser desde 15 hasta varios cientos de nm, no podrían alcanzar, por mera difusión y por azar, la localización subcelular específica donde van a replicarse, debido a la elevada viscosidad que presenta el citoplasma, que no permite la libre difusión de partículas mayores de 500 kDa. La viscosidad del citoplasma se debe a la alta concentración de proteínas, los orgánulos citoplasmáticos y la barrera que supone el propio citoesqueleto (Dauty and Verkman, 2005; Luby-Phelps, 2000; Verkman, 2002).

### **1.1. COMPOSICION DEL CITOESQUELETO Y MECANISMO DE TRANSPORTE ASOCIADO.**

El citoesqueleto es una estructura proteica que permite soportar la membrana plasmática, la formación de estructuras como los lamelipodios, que describiremos más

adelante, el movimiento de vesículas y otros elementos intracelulares. La polimerización controlada de actina y tubulina es responsable de la movilidad de las células eucariotas y de la forma de éstas. El movimiento de las células eucariotas es el resultado de la acción coordinada de formación de extensiones, adherencias y retracciones de la membrana, en donde la red de actina y las interacciones entre estas y los motores moleculares juegan un papel fundamental. Los microtúbulos controlan la distribución espacial de estas actividades, creando una polarización de la célula que determina la dirección del movimiento (Alberts *et al.*, 2006). En el citoesqueleto se pueden encontrar tres tipos de fibras citosólicas de polímeros ordenados a partir de monómeros unidos por enlaces no covalentes: los microfilamentos de actina con un diámetro de 7 a 9 nm (Pollard and Borisy, 2003; Winder and Ayscough, 2005), los filamentos intermedios de 10 nm de diámetro (Kim and Coulombe, 2007) y los microtúbulos de 24 nm (Watanabe *et al.*, 2005) (diagrama 1). Una característica del movimiento de todas las células es la polaridad, esto es, unas estructuras siempre están al frente de la célula (lamelipodio) y otras en la parte posterior. La maquinaria que permite la migración celular está formada por el citoesqueleto de actina, que por su capacidad de ensamblarse y desensamblarse puede cambiar fácilmente la forma de la célula (Alberts *et al.*, 2006). La regulación del citoesqueleto es llevada a cabo por un buen número de quinasas y fosfatasas, distintas GTPasas y proteínas con capacidad de unirse a la actina y a la tubulina (Faix and Grosse, 2006; Hoefen and Berk, 2006; Sheetz *et al.*, 2006; Yazdani and Terman, 2006). El gran tamaño y organización compleja de las células eucariotas requiere un transporte activo y bidireccional para la relocalización eficiente y precisa de los componentes celulares. Para llevar a cabo este transporte, las células eucariotas utilizan proteínas motoras que se desplazan a lo largo del citoesqueleto. Estos motores moleculares son capaces de transportar una carga (como vesículas, orgánulos o virus) obteniendo energía a partir de la hidrólisis de ATP. La miosina es la proteína motora asociada al sistema de la actina (Krendel and Mooseker, 2005) mientras que el transporte a través de los microtúbulos es llevado a cabo por los miembros de las familias de la dineína (Hook and Vallee, 2006; Vallee *et al.*, 2004) y la quinesina (Vale, 2003; Yildiz and Selvin, 2005) que se describirán en detalle más adelante.

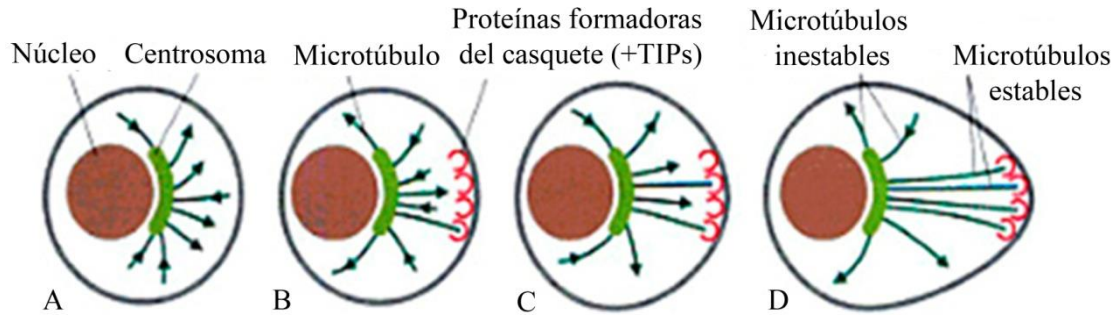


**Diagrama 1. Tipos de filamentos del citoesqueleto.** (A) Se muestran los tres tipos de filamentos existentes en las células y en detalle el de (B) los microtúbulos, (C) filamentos intermedios y (D) microfilamentos. (Adaptado de Alberts *et al.*, 1994; ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org; (Perpina Tordera and Lloris Bayo, 2004).

Los filamentos de actina han sido descritos como responsables del transporte en la periferia celular y posiblemente en el núcleo, aunque los baculovirus, por ejemplo, utilizan este sistema para transportarse por el citoplasma y alcanzar el núcleo de las células que infectan (Charlton and Volkman, 1993; Lanier and Volkman, 1998; van Loo *et al.*, 2001). La barrera cortical de actina en la membrana plasmática puede ser un obstáculo para la entrada de ciertos virus (Delorme-Axford and Coyne, 2011; Marsh

and Bron, 1997). Esta podría ser la razón por la que muchos virus utilizan la vía endosomal para entrar en las células (Cuesta-Geijo et al., 2012; Sieczkarski and Whittaker, 2005; Sloan et al., 2013). Los microtúbulos son los responsables del transporte entre el núcleo y la periferia de la célula. Tienen una polaridad intrínseca, con los polos o extremos bien diferenciados. El extremo con la tasa más alta de polimerización recibe el nombre de extremo positivo, mientras que el otro extremo se conoce como extremo negativo. Por otro lado, la estabilización selectiva de los microtúbulos puede polarizar a la célula. Un microtúbulo neoformado se conserva solo si sus dos extremos están protegidos contra la despolimerización. En las células, los extremos negativos de los microtúbulos en general se hallan protegidos por el MTOC que da origen a estos filamentos. Los extremos positivos en principio están libres pero pueden ser estabilizados por otras proteínas (llamadas “plus-TIPs”)(Larsen et al., 2013).

En una célula polarizada, los microtúbulos crecen y se retraen en varias direcciones pero algunos de ellos se encuentran fortuitamente con proteínas (formadoras del casquete) en una región específica de la corteza celular, las cuales se unen a sus extremos positivos libres y las estabilizan (diagrama 2 B-D). Así pues, estas proteínas, también llamadas +TIPs de *plus-end-tracking*, regulan la dinámica de crecimiento y encogimiento de los filamentos de los microtúbulos, facilitando las conexiones entre las puntas de los microtúbulos y la corteza rica en actina y gobernando la polaridad celular y la migración (Wu et al., 2008). Esta estabilización selectiva determina la rápida orientación de la disposición de los microtúbulos y la célula pasa a estar polarizada (Alberts *et al.*, 2006). Por lo tanto, esta transformación estructural está asociada y facilitada por una amplia remodelación tanto del citoesqueleto de actina y de los microtúbulos (Dustin et al., 2010; Gomez and Billadeau, 2008). La polimerización de actina impulsa el crecimiento radial y juega un papel importante en la estabilización de los contactos adhesivos y otras interacciones receptor-ligando (Huse, 2012). La orientación de los microtúbulos en las células suele ser con los extremos positivos situados en la periferia celular y los negativos próximos al núcleo, bastante juntos y estabilizados por su unión al centro organizador de microtúbulos (MTOC).



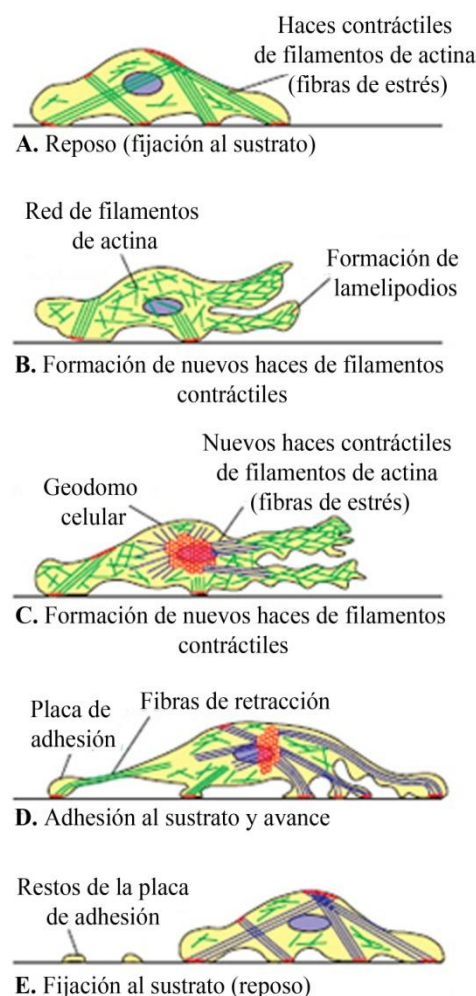
**Diagrama 2. Polarización celular.** (A-D) En esta figura se observa los pasos sucesivos ocurridos en la polarización celular. Los microtúbulos crecen y se retraen en diferentes direcciones (A) y en algunos casos gracias a la acción de proteínas estabilizadoras pueden alcanzar la corteza celular (B). Si se produce un acumulo de microtúbulos estabilizados por estas proteínas se establece una polaridad más marcada (C, D). (Adaptado de Alberts *et al.*, 2006).

Por lo general, el transporte hacia el extremo negativo (retrógrado) y el tránsito de vesículas de Golgi al centrosoma es realizado por las dineínas, mientras que el transporte hacia el extremo positivo (anterógrado) de los microtúbulos es llevado a cabo por las quinesinas o cinesinas (Lodish *et al.*, 2005). Las cargas son movilizadas así hacia el extremo positivo, dirigiéndose a la periferia celular, o negativo, alejándose de la periferia celular, de los microtúbulos (Hesse *et al.*, 2013). De este modo los microtúbulos y el complejo sistema de transporte ligado a microtúbulos forman una red de conexiones en el interior de la célula que sustentan el tráfico intracelular.

Los microtúbulos están formados por moléculas de tubulina que de forma continua se polimerizan en forma de filamentos o se despolimerizan quedando la tubulina en forma soluble. Los microtúbulos tienen una polaridad intrínseca, con los polos o extremos bien diferenciados. El extremo con la tasa más alta de polimerización de moléculas de tubulina recibe el nombre de extremo positivo, mientras que el otro extremo se conoce como extremo negativo y es donde el microtúbulo se despolimeriza. La orientación de los microtúbulos en las células suele ser con los extremos positivos situados en la periferia celular y los negativos próximos al núcleo, bastante juntos y estabilizados por su unión al centro organizador de microtúbulos (MTOC). Por lo general, el transporte hacia el extremo negativo es realizado por las dineínas, que forman parte del complejo motor microtubular como se describe más adelante, mientras que el transporte hacia el extremo positivo de los microtúbulos es llevado a cabo por las quinesinas.

## 1.2. CONEXIONES CELULARES

Los avances recientes en la microscopia en células *in vivo* han revelado algunos aspectos previamente desconocidos del transporte intra- e intercelular. Una célula individual es una estructura funcional que se comunica con otras y se ha demostrado que existen conexiones a corta y larga distancia que permiten un eficiente transporte intercelular de proteínas, vesículas, melanosomas y otros orgánulos (Onfelt et al., 2006;



**Diagrama 3. Formación de lamelipodios para el avance y comunicación intercelular.** Aquí se describen las sucesivas etapas para la formación de lamelipodios para el avance de las células a través del sustrato y para el establecimiento de contactos con células vecinas (Adaptado de Paniagua *et al.*, 2007).

Scott et al., 2002). Se ha demostrado que existe transferencia de receptores y ligandos de membrana entre células conectadas, por ejemplo en neuronas (Bukoreshtliev et al., 2009) o entre células del sistema inmunitario (Williams et al., 2007). En el caso de varios agentes infecciosos se ha demostrado que pueden alcanzar células sanas usando conexiones intercelulares por ejemplo el virus de la pseudorabia (Favoreel et al., 2005) o los retrovirus (Chen et al., 2007; Sherer et al., 2007; Sowinski et al., 2008) y la patogénica proteína priónica ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) que también puede ser transferida de una célula a otra (Gousset et al., 2009). Las estructuras celulares que soportan ese transporte intercelular son variables. Se han descrito diferentes tipos de extensiones de membrana (Davis and Sowinski, 2008). Puentes de filopodios (Sherer et al., 2007), proyecciones celulares (Favoreel et al., 2005) y citonemas en los discos imaginales de *Drosophila* son algunos ejemplos de ello (Ramirez-Weber and Kornberg, 1999). La célula emite lamelipodios para avanzar y despegarse del sustrato. Los lamelipodios están presentes en fibroblastos y otras células móviles (diagrama 3). Para

desplazarse los fibroblastos emiten hacia adelante lamelipodios. Cada lamelipodio es una fina lámina de 100-400 nm de espesor y una superficie de varios  $\mu\text{m}^2$ . Los

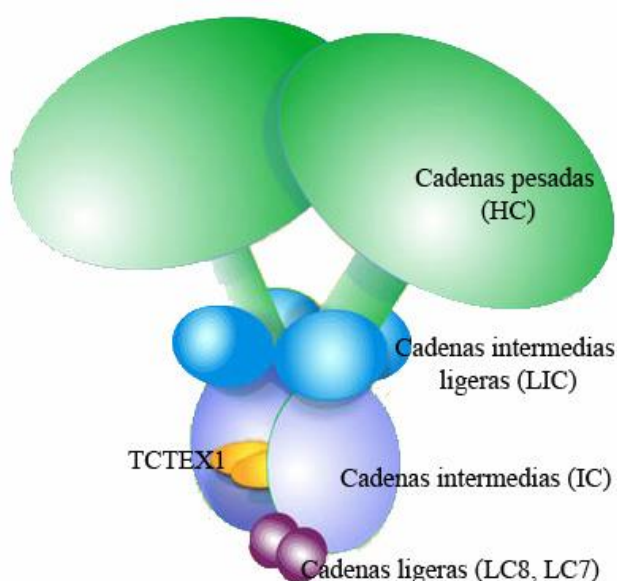
lamelipodios contienen redes de microfilamentos y cuando se fijan al sustrato estas redes se transforman en microfilamentos contráctiles que dan lugar a fibras de estrés. Los lamelipodios establecen contactos con el sustrato (placa de adhesión o fijación) al que se adhieren mientras que los filopodios no llegan a adherirse al sustrato y se repliegan de nuevo al citoplasma. La célula avanza tras el lamelipodio. En este proceso interviene una estructura compuesta de actina que se denomina vértice ó geodomo celular. Desde estos vértices se irradian nuevos haces contráctiles de microfilamentos hacia la periferia celular para formar nuevas líneas de estrés. El fibroblasto así puede avanzar. De esta estructura se emiten transitoriamente numerosas prolongaciones digitiformes muy finas, los filopodios (Paniagua *et al.*, 2007). Los filopodios son proyecciones de membrana plasmática que son ricos en filamentos de actina rígidos (no contráctiles) y herméticamente empaquetados y son estructuras transitorias que no llegan a anclarse al sustrato. Son proyecciones cilíndricas muy delgadas (como espinas) de hasta 50  $\mu\text{m}$  de longitud y 100 nm de diámetro. Son características de los conos de crecimiento axónico y también están presentes en fibroblastos. Pueden crecer por polimerización o por desplazamiento de actina en el extremo positivo, empujando la membrana plasmática y arrastrando componentes celulares. Estas protuberancias celulares funcionan como antenas para las células detectando cambios en su entorno. Además, tienen un papel importante en la migración celular, crecimiento de neuritas y en la cicatrización de heridas y además sirven como precursores para las espinas dendríticas de las neuronas. La iniciación y la elongación de los filopodios dependerán de la polimerización, la convergencia y la reticulación de los filamentos de actina. La proteína responsable de la agrupación de actina en los filopodios es la fascina. Sin embargo, el mecanismo por el cual las funciones de la fascina en formación filopodial no es clara (Mattila and Lappalainen, 2008; Yang *et al.*, 2013). La minimiosina también podría favorecer este crecimiento ya que es una proteína que une los microfilamentos a la membrana plasmática (Paniagua *et al.*, 2007). Por último, los nanotubos (*tunnelling nanotubes*) son canales membranosos transitorios que conectan células a través de un esqueleto de actina y/o tubulina, a veces entre células distantes (Onfelt *et al.*, 2006; Rustom *et al.*, 2004). Son largos y delgados y son capaces de transferir proteínas para su difusión intercelular. Sin embargo, debido a que solo recientemente han mostrado relevancia, hay todavía un cierto desconocimiento de las moléculas específicas involucradas en la biogénesis de esas estructuras, aunque se plantea la hipótesis de que



pueden ser un medio fisiológico importante para la comunicación célula-célula (Mattila and Lappalainen, 2008; Suhail et al., 2013; Yang et al., 2013).

### 1.3. EL PAPEL DE LA DINEINA EN EL TRANSPORTE INTRA- E INTERCELULAR DE DBPs.

La dineína es un motor molecular que utiliza la energía química de ATP para producir trabajo mecánico sobre los microtúbulos. Inicialmente descubierta como la fuerza impulsora de la motilidad flagelar en los cilios de *Tetrahymena*, la dineína ha sido encontrada en un gran numero organismos diferentes y localizaciones celulares. Esta



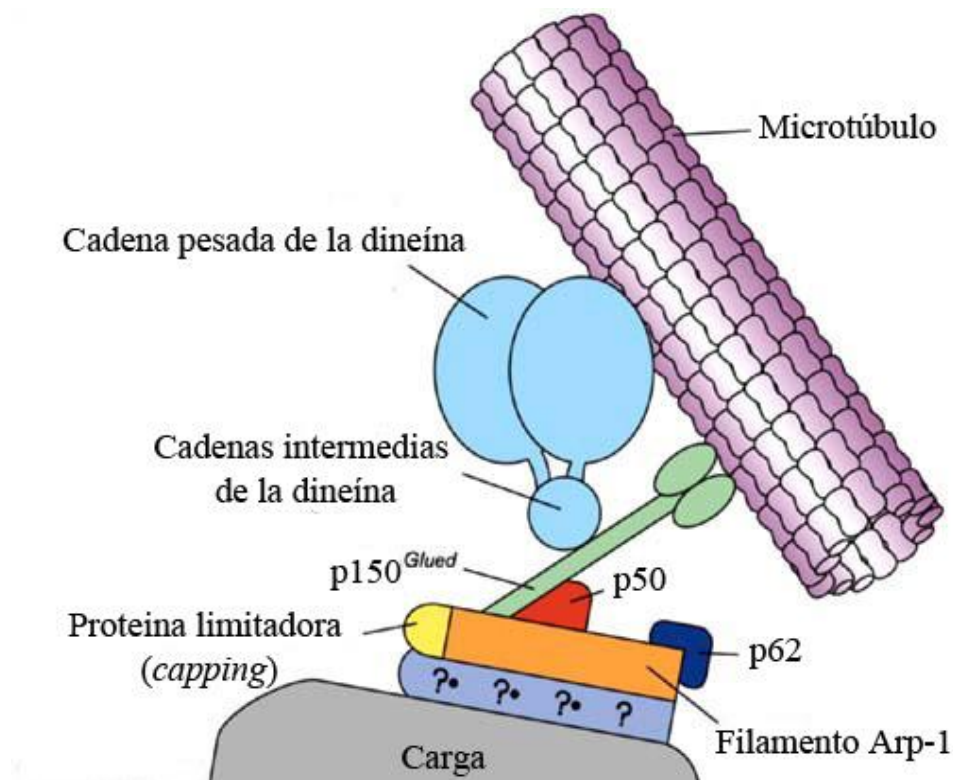
**Diagrama 4. Estructura de la dineína.** Aquí se muestran las diferentes partes que conforman la dineína: cadenas pesadas, intermedias ligera, intermedias, ligeras y TCTEX1 (brazo interno flagelar de la cadena ligera de la dineína). (Adaptado de <http://genomics.energy.gov> website de U.S.A.)

gran familia de motores moleculares consiste en dos clases principales: dineínas axonal y citoplasmática. En este estudio nos centraremos en las citoplasmáticas, las cuales están implicadas en el transporte de diferentes cargas intracelulares y a su vez se subdividen en dos grupos principales. La dineína citoplasmática 1 que es responsable de la movilidad hacia el extremo negativo de los microtúbulos, incluyendo orgánulos de transporte, el posicionamiento del huso mitótico y la segregación nuclear y la dineína citoplasmática 2 (también conocida como dineína de transporte

intraflagellar (IFT) o dineína 1B) que parece funcionar exclusivamente dentro del flagelo, donde transporta partículas a lo largo del axonema hacia el cuerpo de la célula (Cho and Vale, 2012). La dineína está compuesta por diversas subunidades y actúa como una proteína eje dentro del complejo motor microtubular, el cual ejerce diferentes funciones en las células de mamífero. Está compuesta por dos cadenas pesadas que actúan como motor catalítico, una parte central de cadenas intermedias, y varias cadenas ligeras, estas dos últimas interaccionando con las cargas celulares (diagrama 4). Las cadenas ligeras son responsables de una interacción directa con cargas fisiológicas para ser transportadas. El motor dineína existe dentro de un gran conjunto de pequeñas



subunidades no catalíticas, que proporcionan puntos de fijación y regulación de algunas cargas. Estos adaptadores son cruciales para adecuar el motor a su función celular. Los mejor caracterizados son la dinactina (complejo de múltiples subunidades), el complejo formado entre lisencefalia 1 (LIS1) y la proteína nuclear E de distribución (NUDE o de similar estructura a LIS1 y NUDE (NUDEL, también conocida como NDEL), entre otras. Estos factores contribuyen a muchas de las funciones de dineína y, en los casos de dinactina y LIS1, su inhibición o agotamiento es fenotípicamente similar a una pérdida completa de la función dineína (Siglin et al., 2013). Las cadenas intermedias de la dineína se asocian la dinactina, a través de un extremo que se proyecta, llamado p150-glued. La columna vertebral de este complejo se forma gracias a la proteína Arp1 que está relacionada con la actina (diagrama 5). La dinactina es crítica en la mayoría de las funciones de la dineína ya que funciona como un activador del transporte mediado por la dineína de vesículas dirigido al extremo negativo de los microtúbulos (Cho and Vale, 2012; Hernaez et al., 2010; Kardon and Vale, 2009).

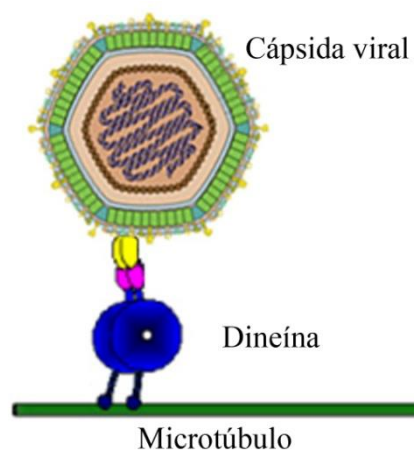


**Diagrama 5.** Estructura del complejo motor microtubular. La figura muestra la dineína junto con las subunidades capaces de adaptar el motor a la función celular. Adaptado de (Allan, 1996).

<b>Virus</b>	<b>Motor Microtubular</b>	<b>Receptor Viral</b>	<b>Referencias</b>
Adenovirus	IC y LIC1 de la dineína	Cápsida hexon	(Dodding y Way, 2011)
Herpes Simplex 1	Cadenas ligeras de la dineína citoplasmática Tctex 1 y Rp3	VP26	(Douglas et al., 2004)
	Complejo motor dineína-dinactina	HSV1 citosólico y cápsidas PrV	(Dodding y Way, 2011)
	Cadena intermedia de la dineína citoplasmática	Proteína de la nucleocápsida (UL34)	(Suikkanen et al., 2003)
	Kinesina-1 y kinesina-2 Kinesina 1 (kinesina convencional /cadena pesada)	Cápsidas HSV1 US11	(Dodding y Way, 2011) (Diefenbach et al., 2002)
Lyssavirus	DYNLL (cadena ligera de 8 KDa de la dineína citoplasmática)	Fosfoproteína	(Jacob et al., 2000; Tan et al., 2007)
Parvovirus Canino	Dineína citoplasmática 1	Cápsida	(Suikkanen et al., 2003)
Vaccinia	Dineína citoplasmática	A27	(Ploubidou et al., 2000; Sanderson et al., 2000; Ward, 2005)
	Kinesina 1 (Kinesina convencional /cadena ligera)	A36R y ND	(Ward y Moss, 2001; Newsome et al., 2004; Ward y Moss, 2004; Herrero-Martínez et al., 2005; Dodding et al., 2011)
VIH	DYNC1H1 DYNLL (cadena ligera de 8 KDa de la dineína citoplasmática)	Complejo de retrotranscripción Integrasa	(McDonald et al., 2002; de Soultrait et al., 2002)
	Kinesina KIF4	Gag	(Kim et al., 1998)
	Dineína citoplasmática	p24 proteína de la cápsida	(Dodding et al., 2011)
Virus de la Gripe	DYNC1H1	ND	(Lakadamyali et al., 2003)
Virus de la Polio	DYNLT1 (cadena ligera de la dineína citoplasmática Tctex 1)	Receptor celular CD155	(Mueller et al., 2002; Ohka et al., 2004; Duran et al., 2007)
Virus de la Rabia	DYNLL (cadena ligera de 8KDa de la dineína citoplasmática)	Proteína P	(Raux et al., 2000; Oksayan et al., 2007)
VPPA	DYNLL (cadena ligera de 8 KDa de la dineína citoplasmática)	p54	(Alonso et al., 2001; Hernaez et al., 2010)
	Kinesina 1 (kinesina convencional/cadena ligera)	ND	(Jouvenet et al., 2004)

**Tabla 1. Relación entre motores microtubulares y diferentes tipos de virus.** La nomenclatura utilizada en esta tabla para la dineína se ajusta a la introducida por Pfister y sus colaboradores (Pfister et al., 2005). Entre paréntesis figura la nomenclatura clásica. Consultar el trabajo de Martínez-Moreno y colaboradores para ver una lista más exhaustiva de interacciones virales con DYNLL (Martínez-Moreno et al., 2003). No se ha demostrado para todos los receptores virales mostrados aquí un papel directo en el transporte de las partículas virales. ND: No determinado.

Así pues, la dineína es responsable del transporte de cargas en las células, hasta un tamaño máximo de carga equiparable al de orgánulos, pero además es responsable del posicionamiento nuclear dentro de la célula y tiene diferentes funciones en la mitosis, entre otras se encarga del reposicionamiento del aparato de Golgi después de la mitosis. Además, la dineína tiene un papel en la desorganización de la envoltura nuclear al inicio de la mitosis y su reorganización posterior (Salina et al., 2002; Shekhar et al., 2013). El transporte sobre microtúbulos a través de los motores de dineína tiene un papel crítico en el transporte y



**Diagrama 6. El papel de la dineína en el transporte del VPPA.** VPPA transportándose por los microtúbulos gracias a su anclaje a través de la dineína (azul). Adaptado de (Scherer and Vallee, 2011)

dispersión de los virus (Dodding and Way, 2011). De hecho, se conocen varios tipos de virus cuyo transporte intracelular está basado en su interacción con la dineína (Tabla 1). Además, la dineína citoplásmica ha sido localizada en sitios de contacto célula-célula y los microtúbulos se proyectan hacia los parches de dineína, donde se anclan (Langworthy and Appel, 2012; Ligon and Holzbaur, 2007) y la disrupción de dineína inhibe la formación de las uniones celulares. La dineína contiene dos cadenas pesadas y varias cadenas intermedias, ligeras intermedias y ligeras (Pfister et al., 2005; Schroer, 2004). La dineína tiene un papel central en la mitosis (Carter, 2013; Karki and Holzbaur, 1999; Raaijmakers et al., 2013), el tráfico intracelular (Kardon and Vale, 2009) y la migración celular (Dujardin et al., 2003). Las cadenas ligeras e intermedias de la dineína, como hemos dicho, son responsables de la interacción directa con las cargas fisiológicas, entre ellas los virus, que van a ser transportadas (diagrama 6). Una de esas cadenas ligeras es de 8kDa, denominada como DYNLL1 (Pfister et al., 2005; Schroer, 2004). La moción dirigida por dineína, en general, está dirigida al extremo negativo del centro organizador de microtúbulos (MTOC) cercano al núcleo. No obstante, se ha demostrado que ésta molécula es capaz de dirigir bidireccionalmente las cargas celulares hacia los extremos positivos o los negativos de los microtúbulos (Hendricks et al., 2010; Hendricks et al., 2012). Como se acumula en los extremos positivos “plus”, este motor molecular ha sido añadido a la lista de las proteínas direccionadoras a los extremos positivos o “*plus-end-tracking*” (también llamadas +TIPs) como se explica más adelante. Este grupo de moléculas regula la dinámica de crecimiento y decrecimiento de

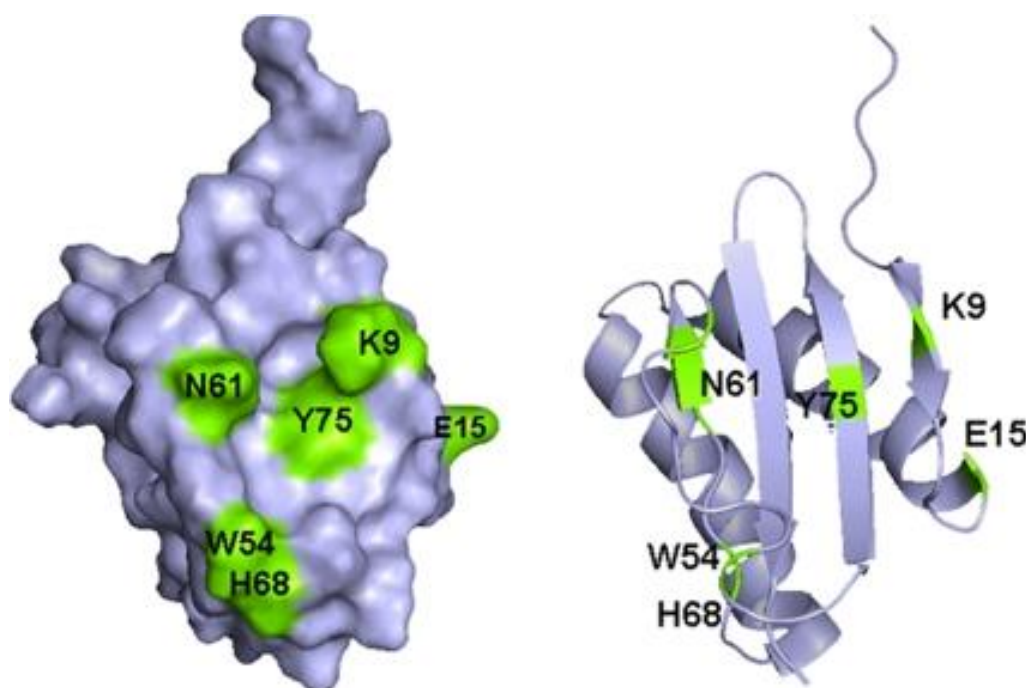
los filamentos de los microtúbulos, facilitando las conexiones entre las puntas de los microtúbulos y la corteza rica en actina y gobernando la polaridad celular y la migración (Wu et al., 2008).

## **2. VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA): VIRUS Y PROTEINAS VIRALES INVOLUCRADAS EN EL TRANSPORTE INTRACELULAR.**

El VPPA es el agente etiológico de la Peste Porcina Africana (PPA), enfermedad altamente contagiosa que afecta a la mayoría de miembros de la familia *Suidae*. La PPA presenta un cuadro prácticamente asintomático en sus hospedadores naturales, que son los cerdos salvajes africanos. Estos animales pueden ser persistentemente infectados, convirtiéndose en portadores del virus. El VPPA pertenece al grupo de los arbovirus y, como tal, es capaz de infectar a garrapatas que parasitan a estos animales. Las garrapatas se convierten así en transmisores del virus en el ciclo salvaje del VPPA, actuando además como importantes reservorios del VPPA en la naturaleza (Plowright et al., 1969; Thomson, 1985). Las células diana del virus en el animal son las de la línea monocito/macrófago (Gomez-Villamandos et al., 2003) aunque en este trabajo se han utilizado células Vero adaptadas al VPPA por su estabilidad y rápido crecimiento. El VPPA penetra en la célula diana a través de endocitosis mediada por receptor. Los endosomas tempranos y tardíos son necesarios para el éxito de la infección de VPPA. El virus entrante tiene acceso a los endosomas tempranos inmediatamente después de entrar en la célula a través de la formación de una vesícula envuelta en clatrina. Tras la maduración del endosoma temprano, el virus se incorpora a los MVBs, progresando hasta alcanzar el endosoma tardío y debido al pH ácido de estos orgánulos, la desencapsidación tiene lugar. Este paso sería esencial para el progreso de la infección viral. Este modelo propuesto incluye papeles centrales para la GTPasa Rab7 y también inhibidores de la proteasa de membrana, PtdIns3P y PtdIns (3,5) P2, que orquestan el mantenimiento de la homeostasis a lo largo de la vía (Cuesta-Geijo et al., 2012)

Varias proteínas virales del VPPA, como la p30 y la p72, se han descrito como claves en el proceso de la infección (Hernaez et al., 2008; Neilan et al., 2004). De entre las proteínas del virus de la peste porcina africana cabe destacar la importancia de la p54 una proteína mayoritaria del virus y esencial en la infección. En un análisis de la interacción del virus con el huésped se pudo demostrar que esta proteína se une a la

cadena ligera de la dineína (DYNLL1) a través de una corta secuencia en su extremo carboxi-terminal (Esquema 1). Esta es una interacción química de alta afinidad que ha sido estudiada mediante resonancia magnética nuclear en colaboración con el Dr. Erenest Giralt de la Universidad de Barcelona, llegándose a definir el sitio de unión y secuencias peptídicas que son capaces de desplazarla perjudicando severamente la infección viral (Hernaez et al., 2010). Mediante la unión de p54 a la dineína el virus es capaz de viajar a través de la célula superando así la barrera citoplásmica y llegando a la zona perinuclear para empezar su etapa replicativa (diagrama 7).



**Diagrama 7.** Mapeo de los residuos que interactúan con p54 en la superficie DLC8 (PDB número de acceso 1PWJ). Los residuos que interactúan se muestran en verde (Hernaez et al., 2010).

## 2.1. PEPTIDOS DERIVADOS DEL VPPA CON CAPACIDAD DE PENETRACIÓN CELULAR.

Para la entrega ó *delivery* de proteínas y DNA en el interior de las células se ha utilizado diversos péptidos con capacidad de penetración celular (*cell penetrating peptides*, CPPs) con amplias aplicaciones en terapias anti-tumores (Martin and Rice, 2007), generación de células madre pluripotentes inducidas por proteína (piPSCs) (Zhou et al., 2009) y vacunas (Granadillo et al., 2011) entre otros. Algunos de estos péptidos son de origen viral, como el péptido Tat de HIV o CPPs con poli-arginina (Bolhassani, 2011). Sin embargo, existen pocos trabajos que hayan analizado su transporte y distribución

intracelular. Como se ha comentado anteriormente, el transporte intracelular de las distintas cargas a través del citoesqueleto requiere de motores asociados a microtúbulos, quinesinas y dineína citoplásmica además de motores de miosina asociados a actina. El transporte basado en microtúbulos es esencial para que la célula establezca la polaridad y asimetría necesarias para realizar sus funciones. La polarización celular está asociada con la estabilización y reorganización selectiva del conjunto de microtúbulos. Los microtúbulos actúan como la pista sobre la cual viajan los motores moleculares distribuyendo las cargas celulares a la vez que transportan orgánulos. El sistema endocítico y la maquinaria de señalización celular también dependen del transporte ligado a microtúbulos. Basándonos en los mecanismos usados por VPPA para el transporte intracelular, seleccionamos una serie de secuencias peptídicas derivadas de una proteína viral conocida por unirse a dineína. Basándonos en las propiedades de esta molécula, enunciamos la hipótesis de que los péptidos uniéndose a la dineína aumentarían su habilidad de transporte en el interior celular cuyo estudio es el objeto de este trabajo de tesis.

Para promover la capacidad de transporte de estas moléculas, introdujimos secuencias con una conocida habilidad de unión al sistema motor celular y las cuales son capaces de transportar una carga dentro de la célula. El movimiento de los DBPs en el citoplasma es característicamente bidireccional en repetidas series cortas de transporte anterógrado y retrógrado finalizando con largos recorridos hacia el córtex en áreas polarizadas del citoplasma. Aquí describimos la capacidad dinámica de los DBPs que son nuevas herramientas, sirviendo de sondas moleculares para el estudio de la dinámica del citoesqueleto, para promover y analizar conexiones intercelulares y transporte y potencialmente para aplicaciones de reparto celular mediado por péptidos.

### **3. SISTEMA DE REPARTO CELULAR CON NANOPARTÍCULAS DE ORO (NPs) FUNCIONALIZADAS CON DBPs.**

Recientes investigaciones se han centrado en el diseño de sistemas de reparto celular que prescindiendo de vectores virales completos sean capaces de atravesar barreras extra e intracelulares para alcanzar el citoplasma o el núcleo de la célula (Falanga et al., 2011; Pichon et al., 2010). Para ello, se han utilizado nanopartículas de multicomponentes sintéticos que son diseñadas para superar esas barreras y que

mimetizan como patógenos intracelulares como los virus transfieren su material genético al interior de las células. La membrana citoplásmica es la primera barrera a superar para la liberación intracelular. Varias estrategias han sido testadas para aumentar el mecanismo de captación de las nanopartículas sintéticas, su transporte endosomal y el escape de los endosomas antes de su degradación lisosomal y para aumentar la eficiencia de transfección. Se han utilizado ligandos conjugados a la superficie de las nanopartículas modificadas, como azúcares (Moros et al., 2012), para influenciar el modo y la eficacia de su internalización celular (Bareford and Swaan, 2007). Sin embargo, se ha comprobado también que nanopartículas de la misma composición pueden usar mecanismos alternativos para la entrada celular en diferentes tipos celulares (dos Santos et al., 2011). Una vez dentro de la célula y dada la composición gelificada del citoplasma, el movimiento browniano de los orgánulos y las macromoléculas es restrictivo. Además, las células eucariotas son compartimentalizadas por un complejo sistema de endomembranas y los filamentos del citoesqueleto de actina y microtúbulos son usados como vías de transporte entre compartimentos. Este transporte se basa en motores moleculares dependientes de energía que son necesarios para la comunicación intercompartimental.

### **3.1. NPs FUNCIONALIZADAS CON DBPs SINTETIZADOS A TRAVÉS DE SECUENCIAS DE VPPA.**

Moverse en un ambiente celular concurrido plantea problemas en cuanto a la progresión de las nanopartículas y los avances más recientes en este campo incluyen diferentes modificaciones y mediadores del tráfico intracelular en el diseño de vectores (Barua and Rege, 2010; Ng et al., 2009), algunos de ellos considerando el citoesqueleto (Conway et al., 2012; Ruenraroengsak and Florence, 2010) para poder alcanzar un transporte más eficiente e incluso evitar la neutralización por el sistema inmunitario (Storm *et al.*, 1995). Como se ha mencionado anteriormente, los virus han desarrollado estrategias específicas para entrar en la célula mediante endocitosis y finalmente escapar del endosoma pero también muchos de ellos codifican proteínas que se unen a motores microtubulares para facilitar el transporte (Alonso et al., 2001; Cuesta-Geijo et al., 2012; Kelkar et al., 2004), como es el caso de la proteína p54 del VPPA. Otra barrera para la entrega génica en células en fase de postmitótica es la membrana nuclear. Diferentes aproximaciones para alcanzar el compartimento nuclear incluyen señales de localización nuclear (NLS) en el diseño de las nanopartículas, pero esos modelos no han

tenido la eficacia esperada (Symens et al., 2011). En el presente trabajo de tesis, se han utilizado secuencias de origen vírico con capacidad de unión a dineína para funcionalizar nanopartículas de oro (NPs)(Pelaz et al., 2013) basándonos en la hipótesis de que esta fusión podría aumentar la movilidad y dispersión de las nanopartículas modificadas en el ambiente intracelular, desarrollándose así una aplicación de alto valor potencial en biomedicina.





## **Objetivos**

El virus de la PPA requiere del citoesqueleto para la entrada y el transporte desde la membrana plasmática hasta su lugar de replicación en la zona perinuclear de la célula. Para ello secuestra el sistema de transporte microtubular mediante la unión de la proteína viral p54 a la cadena ligera de la dineína facilitando el transporte del virus a través de los microtúbulos. Péptidos sintetizados a partir de la secuencia de la p54 con capacidad de unión a la dineína tendrían propiedades dinámicas y facilitarían el transporte en el interior de la célula y podrían ser la base de un sistema de transporte o reparto de compuestos terapéuticos en el interior celular. Basados en esta hipótesis de trabajo, en la presente tesis doctoral nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Diseñar y sintetizar diferentes secuencias peptídicas a partir de la secuencia de la proteína viral p54 y otras proteínas víricas con capacidad de unión a dineína.
2. Estudiar el comportamiento de estos péptidos de unión a dineína analizando su acumulación y transporte en diferentes líneas celulares de interés mediante microscopía de tiempo real.
3. Estudiar la implicación del citoesqueleto y la vía endocítica en el transporte de los péptidos.
4. Explorar su capacidad como nuevas herramientas o sondas moleculares para el estudio de la dinámica del citoesqueleto, su potencial capacidad de promover conexiones intercelulares y transporte a través de ellas.
5. Funcionalizar nanopartículas de oro con dichos péptidos para aumentar su capacidad de difusión y analizar su potencial capacidad como método de reparto celular.
6. Estudiar las características funcionales y el comportamiento intracelular de las nanopartículas funcionalizadas en diversas líneas celulares para valorar su potencial uso como herramienta de reparto celular de moléculas terapéuticas.



## **Materiales y Métodos**

## 1. CULTIVOS CELULARES

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron diferentes líneas celulares. Se utilizó de forma mayoritaria la línea celular Vero (ATCC CCL-81) derivada de fibroblastos de riñón de mono verde africano, debido a su estabilidad y rápido crecimiento, pero también se utilizaron otros tipos celulares como las células COS-7 (ATCC CRL-1651) que son células similares a fibroblastos que fueron obtenidas inmortalizando una línea celular CV-1 derivada de células de riñón de mono verde africano con una versión del genoma de SV40, las células HEK 293T/17 (ATCC CRL-11268) que es una línea celular renal embrionaria humana, las SK-N-MC (ATCC HTB-10) que son de neuroblastoma humano y de origen neurogénico, las MDCK (*Madin-Darby Canine kidney cells*) (ATCC CCL-34) que son células epiteliales renales, las HeLa (ATCC CCL-2) que son una línea celular inmortal de origen epitelial, derivada de células de cáncer de cuello uterino epidérmicas y las líneas celulares de insecto Sf21y Tn5 (IPLB-SF21-AE, derivada del tejido ovárico del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*. Y BTI-Tn-5B1-4, derivada de células de ovario del insecto *Trichoplusia ni*, respectivamente). A lo largo de la tesis, se realizaron incubaciones con los diferentes péptidos de interés. En general, las células Vero y HEK 293T/17 se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM, de Gibco, suplementado con suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (30 min a 56° C) al 5% (v/v), L-glutamina 2mM (Gibco), penicilina 100 UI/ml (Gibco) y estreptomycin 100 µg/ml (Gibco). Las células crecieron en condiciones controladas de temperatura (37°C) y CO<sub>2</sub> (5%), subcultivándose cada 2 días empleando tripsina/EDTA (0.25% y 0.025% p/v respectivamente; Gibco) para despegarlas de los frascos de cultivo. En cuanto a las COS-7 y Hela se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM, de Gibco, suplementado con suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (30 min a 56° C) al 10% (v/v), L-glutamina 2mM (Gibco), penicilina 100 UI/ml (Gibco) y estreptomycin 100 µg/ml (Gibco). Las células crecieron en condiciones controladas de temperatura (37°C) y CO<sub>2</sub> (5%), subcultivándose cada 2-3 días empleando tripsina/EDTA (0.25% y 0.025% p/v respectivamente; Gibco) para despegarlas de los frascos de cultivo. En cuanto a las células SK-N-MC se cultivaron en Minimum Essential Medium (MEM), de Gibco, suplementado con suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (30 min a 56° C) al 20% (v/v), L-glutamina 2mM (Gibco), penicilina 100 UI/ml (Gibco) y estreptomycin 100 µg/ml (Gibco), piruvato sódico 0.01% (p/v) (Merck) y NaHCO<sub>3</sub> 0.2% (p/v) (Merck). Las células crecieron en condiciones controladas de temperatura (37°C) y CO<sub>2</sub> (5%), subcultivándose cada 3 días

empleando tripsina/EDTA (0.25% y 0.025% p/v respectivamente; Gibco) para despegarlas de los frascos de cultivo. Además, debido a su escasa capacidad de adherencia en placa utilizamos un recubrimiento de fibronectina (3µg/ml) incubado a 4°C 24 horas antes de la siembra de células. En cuanto a las células MDCK se cultivaron en Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), de Gibco, suplementado con suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (30 min a 56° C) al 5% (v/v), L-glutamina 2mM (Gibco), penicilina 100 UI/ml (Gibco) y estreptomicina 100 µg/ml (Gibco). Las células crecieron en condiciones controladas de temperatura (37°C) y CO<sub>2</sub> (5%), subcultivándose cada 2 días empleando tripsina/EDTA (0.25% y 0.025% p/v respectivamente; Gibco) para despegarlas de los frascos de cultivo. Finalmente, las líneas celulares Tn5 y Sf21 se cultivaron en TNM-FH *insect medium* (Sigma) suplementado con suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (30 min a 56° C) al 10% (v/v), penicilina 100 UI/ml (Gibco), gentamicina 50µg/ml (Gibco) y NaHCO<sub>3</sub> (0.35g/l). Las células crecieron en condiciones controladas de temperatura (28°C) y CO<sub>2</sub> (0%), subcultivándose cada 2-3 días empleando tripsina/EDTA (0.25% y 0.025% p/v respectivamente; Gibco) y un raspador para despegarlas cuidadosamente de los frascos de cultivo. Para hacer los pases de cultivo, las células se contaban con una cámara de Neubauer y tiñéndolas con el colorante vital azul de Tripán (Merck). El azul Tripán fue utilizado también para evaluar la toxicidad de las distintas drogas usadas en los experimentos.

## **2. DISEÑO DE PÉPTIDOS E INCUBACIONES.**

### **2.1. Diseño de péptidos.**

Para la realización de esta tesis uno de los aspectos fundamentales ha sido el diseño de péptidos a partir de secuencias de origen viral y celular de interés para el transporte intracelular. En este trabajo se describen las secuencias de péptidos que abarcan el dominio de unión DYNLL1 de proteínas virales (Tabla 6), Peste porcina africana p54 (DynPro) y una secuencia más corta que incluye los aminoácidos críticos para dicha unión (ShortPro), la proteína P del virus de la rabia (TransRb), la miosina V celular (TransMy) y un péptido control que consiste en una secuencia aminoacídica aleatoria sin motivo de unión a dineína. Una cola de octaarginina fue añadida y después fueron marcados con carboxitetrametilrodamina (TAMRA). Los péptidos fueron sintetizados y purificados por HPLC obteniendo una pureza del 95% por Genecust.

## 2.2. Incubación de péptidos en células.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo bajo condiciones de esterilidad y seguridad trabajando con cabinas microbiológicas de seguridad de clase II. Los péptidos liofilizados después de su síntesis se resuspendieron en agua, con un grado de pureza mQ y estéril, para obtener soluciones stock a 5 mM. Se prestó atención especial para evitar turbiedad en la solución y las puntas fueron siempre usadas con un filtro para evitar posibles contaminaciones cruzadas. Alícuotas de 50  $\mu$ l se almacenaron a -20° C hasta su uso. Las soluciones de trabajo de los péptidos se hicieron a partir de las soluciones stock en el medio correspondiente al tipo celular usado pero sin la adición de suero que producía coagulación de los péptidos disminuyendo así su eficacia y se ajustaban a 10  $\mu$ M la cual era la concentración óptima para incubaciones in vivo y 100  $\mu$ M para Inmunofluorescencia (debido a la pérdida de señal por el efecto de la fijación de las células la concentración de péptido tenía que ser mucho mayor). Este procedimiento se llevó a cabo justo antes de que los péptidos se añadieran al cultivo celular para evitar degradación. Las células fueron incubadas en placas de cultivo estériles de 35mm con los péptidos durante 1 hora, o a diferentes tiempos en caso de estudio de acumulación intracelular, a 37 o 28°C según el tipo celular y tras un lavado con medio nuevo fueron analizadas por las diferentes técnicas descritas más adelante.

## 3. SINTESIS DE NANOPARTICULAS (NPs) Y CARACTERIZACIÓN

### 3.1. Compuestos químicos para la síntesis de nanopartículas

Todos los compuestos eran de grado reactivo y se usaron sin necesidad de purificación adicional. Hidrogenotetracloroaureato (III) trihidratado (99.9%), (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreto, Tris(hidroximetil) aminometano (TRIS, >98.8%) y 2-[N-morfolino] ácido etanosulfónico (99.5%) se compraron a Sigma-Aldrich; N-(2-mercaptopropionil) glicina (>98%) y N-hidroxisulfosuccinimida (>97%) y NaBH<sub>4</sub> (98%) se compraron a Fluka y Lancaster, respectivamente. Los péptidos con capacidad de unión a dineína (DBPs, como DynPro, ShortPro) y el péptido control (IntCt) se compraron a Genecust,  $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -amino polietilenglicol (CH<sub>3</sub>O-PEG-NH<sub>2</sub>, 750 Da) se obtuvo de Rapp-Polymere. Phosphate buffer salino (PBS) se obtuvo de Lonza. El agua destilada fue adicionalmente purificada usando un sistema de agua de grado reactivo Milli-Q (Millipore). Los tampones fueron preparados según el procedimiento estándar de laboratorio. Otros agentes químicos eran de grado reactivo y fueron usados tal cual recibidos.



### 3.2. Caracterización

Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis) se llevó a cabo con el espectrofotómetro *Varian Cary 50*. Espectroscopia de fluorescencia se llevó a cabo con un espectrómetro de fluorescencia LS-55. Las medidas de potenciales zeta se hicieron usando un analizador ZetaPALS de Brookhaven. Todos los espectros se recogieron en agua MilliQ; Para la caracterización del potencial Z la solución acuosa se ajustó a 1 mM KCl. Para los ensayos del TEM, una sola gota (10  $\mu\text{L}$ ) de solución acuosa (0.1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de las nanopartículas de oro se colocó en una rejilla de cobre recubierta con una película de carbón. La rejilla se dejó secar al aire libre durante varias horas a temperatura ambiente. El análisis con TEM se llevó a cabo con un microscopio Tecnai 20 FEI operado a 200 KV. La distribución granulométrica de las nanopartículas de oro se evaluó a partir de diferentes micrográficas usando un programa de procesamiento de imágenes y análisis (ImageJ). El número de partículas seleccionadas para su examen fue alrededor de 400, las cuales resultaron en una estadística de tamaño-distribución estable (Figuras 14 y 15).

### 3.3. Au@tiopronina

Hidrogenotetracloroaureato (III) trihidrato (0.15 g, 0.4 mmol) y N-(2-mercaptopropionil) glicina (tiopronina; 0.19 g, 1.2 mmol) fueron codisueltos en 20 mL de ácido 6:1 metanol/acético, dando una solución rojo rubi.  $\text{NaBH}_4$  (0.30 g, 8.0 mmol) en 7.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  fue añadido con agitación rápida. La suspensión negra que se formó se agitó durante 30 minutos adicionales después del enfriado, y el solvente se eliminó por vacío a 40 °C. El crudo de Au@tiopronina era completamente soluble en metanol y bastante soluble en agua. Fue purificado por diálisis, en la que el pH de 130 mg de producto crudo disuelto en 20 ml de agua se ajustó a 1 por adición gota a gota de HCl concentrado. Esta solución se cargó en unos segmentos de 15cm de membrana de diálisis de éster de celulosa sin fisuras (Sigma, MWCO 10 kDa), colocados en cubetas de precipitación de agua de 4L, y fueron agitados lentamente, recargando con agua fresca aproximadamente cada 10h en el transcurso de 72h. Las soluciones de Au@tiopronina fueron recogidas de los tubos de diálisis y fueron liofilizadas. Rendimiento: 96 mg. Diámetro medio: 2.8 nm. Z-potential,  $\zeta(\text{Au@tiopronin}) = -40 \pm 5.78 \text{ mV}$ .

### 3.4. Au@Tio@DBPs

(N-(3-Dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC; 1 mg, 5  $\mu\text{mol}$ ) y N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo NHS; 3 mg, 13.5  $\mu\text{mol}$ ) fueron añadidos a 1 mL de Au@tiopronina (1 mg) en ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico (MES) (50 mM, pH 6.5). Se dejaron reaccionar las NPs con EDC (activación de carbodiimida) durante 30 min a 37°C bajo suaves condiciones de agitación. NPs fueron entonces purificadas del exceso de EDC y sulfo NHS mediante una columna PD-10 (GE Healthcare). El péptido DynPro (118  $\mu\text{g}$ ; 27.5 nmol) o ShortPro (98  $\mu\text{g}$ ; 27.5 nmol) o TransRb (113  $\mu\text{g}$ ; 27.5 nmol) o IntCt3 (113  $\mu\text{g}$ ; 27.5 nmol) o TAMRA (5 o 6-TAMRA-cadaverine) (28.3  $\mu\text{g}$ ; 55 nmol) se añadieron y la mezcla se agitó durante 1h a temperatura ambiente antes de la adición de TRIS o  $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$  (750 kDa, 1950  $\mu\text{g}$ ; 2.6  $\mu\text{mol}$ ) para acoplarlos y saturar a los grupos carboxílicos restantes; Entonces las muestras se dejaron en suaves condiciones de agitación a 4°C durante la noche. Entonces esta solución se cargó en unos filtros centrífugos (Amicon Ultra-0.5 mL, MWCO 10 kDa) para tres pasos consecutivos de purificación de péptidos potencialmente desacoplados o TAMRA o PEG o TRIS y la concentración de la mezcla antes de la suspensión en agua. Para prevenir una posible absorción (no unido covalentemente a las NPs) de TAMRA o alguno de los péptidos, las muestras (0.5 mL a 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) se cargaron en unos segmentos de membrana de diálisis de éster de celulosa sin estrías de aproximadamente 1cm (Sigma, MWCO 10 kDa), colocados en cubetas de 1L de una solución de 1 M NaCl en agua MilliQ y agitado lentamente en el transcurso de 72h, recargando solución salina fresca aproximadamente cada 10h. Entonces, las muestras con NPs se dializaron mediante una columna PD-10, se concentraron con filtros centrífugos (Amicon Ultra-0.5 mL, MWCO 10 kDa), se suspendieron en PBS (para cultivos celulares) o en agua (para caracterización) a 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , y se filtraron con un filtro de celulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  para su esterilización. Las NPs con la proteína M2 de Influenza unida (Au@Tio@DynPro-M2) se sintetizaron siguiendo este procedimiento. Los espectros de UV-Vis y fluorescencia se muestran en la figura 14.

### 3.5. Au14@DBPs

Estas NPs de oro con un diámetro medio de  $\sim 14$  nm y recubiertas con citrato fueron sintetizadas por el método de reducción citrato descrito por Lee y Meisel (Lee and Meisel, 1982). Brevemente, hidrogeno de tetracloroaurato (III) hidratado (Strem Chemicals) (0,2 g, 0,589 mmol) se disolvió en 500 ml de agua destilada, se calentó y se

agitó a reflujo. Cuando la solución hierve, se añade citrato de sodio dihidratado (0,57 g, 1,94 mmol) dando como resultado una solución de color rojo. La solución se mantiene en ebullición y protegida de la luz durante 30 min, con lo cual se enfría.

Para aumentar la estabilidad, la biocompatibilidad, y la funcionalidad química, las AuNPs fueron funcionalizadas con cadenas heterofuncionales de poli (etilenglicol) (PEG). Este PEG (HS-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-CONH-PEG-O-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-COOH, de peso molecular 3 kDa, disponible comercialmente *Rapp-polymere*) está modificado con un grupo tiol en un extremo, permitiendo la unión a la superficie de Au. En el otro extremo del PEG, un grupo carboxilo proporciona los radicales de anclaje para la unión covalente de moléculas que contienen amina a través de química de la carbodiimida. Como las AuNPs recubiertas con citrato (500 ml) se complementaron con exceso del espaciador PEG (10 mg), se formó una cubierta de PEG densamente empaquetada. Para facilitar el enlace oro-tiol el pH de la solución se ajustó a 12.0, mediante una solución concentrada de NaOH. Las muestras se dejaron durante toda la noche reaccionando (intercambio de ligando) bajo condiciones de agitación suaves. El aumento de la estabilidad coloidal permite el lavado de las NPs por centrifugación (se centrifugó durante 30 min a 14.000 rpm y se resuspendieron los pellets en agua Milli-Q). Las muestras se caracterizaron por TEM, UV-Vis y potencial-Z (-40 mV a pH 6,5). El espectro UV-Vis de estas nanopartículas muestran la típica banda de plasmón centrada en 519nm (Figura 15).

### 3.6. Incubación de nanopartículas en células

Todos los experimentos fueron llevados a cabo bajo condiciones de esterilidad y seguridad trabajando con cabinas microbiológicas de seguridad de clase II. Las nanopartículas se resuspendieron en agua, con un grado de pureza mQ y estéril, para obtener soluciones stock a diferentes concentraciones. Se prestó atención especial para evitar turbiedad en la solución y las puntas fueron siempre usadas con un filtro para evitar posibles contaminaciones cruzadas. Alícuotas de 500 µl se almacenaron a 4° C hasta su uso. Las soluciones de trabajo de las nanopartículas se hicieron a partir de las soluciones stock en el medio pertinente según la línea celular usada y ajustadas a 0.2mg/ml la cual era la concentración óptima. Este procedimiento se llevó a cabo inmediatamente antes de que las nanopartículas se añadieran al cultivo celular para evitar degradación. Para realizar ensayos in vivo, 10<sup>5</sup> células Vero se cultivaron en placas de vidrio de 35mm durante la noche. Las células se lavaron con medio nuevo y el

medio existente se reemplazó por 300ml de las soluciones que contenían las nanopartículas a la concentración óptima. Las nanopartículas se incubaron en cámaras de incubación a 37° C y 5% CO<sub>2</sub> (sin CO<sub>2</sub> en caso de células de insecto) a la concentración óptima y observadas con el microscopio confocal. Los períodos de tiempo de incubación variaron de 20 minutos a 3 horas para observar los diferentes estadios de acumulación en las células.

#### **4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

##### **4.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Las células se sembraron a una densidad de  $2,5 \times 10^4$  céls/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro (Geber-Lab). Una vez transcurrido el tiempo de transfección o incubación con péptidos o nanopartículas deseado, las células se fijaron con paraformaldehído (Sigma) al 3.7 % en PBS durante 10 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma) al 0.1 % en PBS durante 15 minutos. Una vez fijadas y permeabilizadas, las muestras se bloquearon con BSA (Sigma) al 2% durante 5 min en PBS a temperatura ambiente. Las células se incubaron con la correspondiente dilución del anticuerpo primario (Tabla 2) en PBS, durante 5 min a 37° C en cámara húmeda, mientras que la incubación con la dilución correspondiente del anticuerpo secundario se realizó durante 5 min en cámara húmeda y oscuridad a temperatura ambiente. Después de cada paso se lavaron las células con PBS. Al hacer dobles marcajes, siempre se seleccionaron combinaciones de fluoróforos que tuvieran una máxima distancia en el espectro de emisión (Tabla 3). La detección de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante un lavado de las células durante 10 minutos con TO-PRO-3 (Molecular Probes, Invitrogen) 1:1000 en PBS. Para montar el cubreobjetos sobre el portaobjetos se utilizaron 10 µl de medio de montaje ProLong (Molecular Probes, Invitrogen) y finalmente se sellaron las muestras con laca de uñas. Cada experimento se repitió tres veces. Especificidad de etiquetado y de ausencia de ruido de fondo se determinaron mediante el examen de muestras de control individualmente etiquetadas.

Anticuerpo primario	Uso/Dilución	Procedencia
Anti-DLC8 (policlonal, conejo)	IFI - 1:100	[28]
Anti-M2 Influenza (policlonal, ratón)	IFI - 1:600	Dr. José M. Escribano (INIA, Madrid)
Anti- $\alpha$ -tubulina (monoclonal, ratón)	IFI - 1:2000 WB - 1:2000	Sigma
Anti- $\alpha$ -tubulina acetilada (monoclonal, ratón)	IFI - 1:2000 WB - 1:2000	Sigma
Anti- $\alpha$ -Tubulin-FITC (monoclonal, ratón)	IFI - 1:50	Sigma
Anticuerpo secundario	Uso/Dilución	Procedencia
Anti IgG de ratón Alexa Fluor TM 488	IFI - 1:200	Molecular Probes
Anti IgG de ratón Alexa Fluor TM 647	IFI - 1:200	Molecular Probes
Anti IgG de conejo Alexa Fluor TM 488	IFI - 1:200	Molecular Probes
Anti IgG de ratón-HRP	WB - 1:5000	GE Healthcare
Cromógeno	Uso/Dilución	Procedencia
Alexa Fluor 488 - faloidina	IFI- 1:200	Sigma
Alexa Fluor 647 - faloidina	IFI- 1:200	Sigma
Alexa Fluor 488 - WGA	IFI- 1:200	Invitrogen
TO-PRO-3 Iodide	IFI- 1:1000	Sigma

**Tabla 2. Anticuerpos y Cromógenos.** Aquí mostramos todos los anticuerpos primarios y secundarios y cromógenos usados así como sus concentraciones de uso y su casa comercial.

Fluoróforo	Máxima absorción (nm)	Máxima emisión (nm)
Alexa Fluor TM 488	495	519
TAMRA	565	580
Alexa Fluor TM 647	650	665
TO-PRO 3 Iodide	642	661

**Tabla 3. Espectros de absorción y emisión de fluoróforos.** En esta tabla mostramos los fluoróforos utilizados en los experimentos así como su espectro de absorción y emisión.

## 4.2. Western Blot

Células Vero sembradas en placas de 24 pocillos se incubaron con péptidos a 100  $\mu$ M durante 1, 2 y 3 horas en experimentos paralelos. Un control negativo de células Vero sin los péptidos se llevó a cabo para comparación. Esto se repitió dos veces más. A continuación, las células se incubaron con 50  $\mu$ l tampón de muestra de Laemmli, se sonicó durante 1 min, se incubó a 100°C durante 5 min y se recogieron. Después, las muestras se sometieron a electroforesis y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Para detectar  $\alpha$ -tubulina y tubulina acetilada, las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -tubulina y anti-tubulina acetilada diluidos 1:2000 como se ha descrito previamente. Anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano picante (HRP) utilizados eran anti-ratón (GE Healthcare) y fueron diluidos 1:5,000. Bandas obtenidas después del desarrollo con el reactivo ECL (GE Healthcare) y que corresponden a  $\alpha$ -tubulina y tubulina acetilada se cuantificaron densitométricamente, y los datos se normalizaron a los valores de control utilizando un analizador de imágenes (ImageLab).

## 5. MICROSCOPIA

### 5.1. Microscopía de fluorescencia convencional

De manera rutinaria, se empleó un microscopio dotado de cámara digital (Leica) y de los filtros necesarios para detectar la emisión de fluorescencia de los fluoróforos y cromógenos utilizados y descritos en esta tesis.

## 5.2. Microscopía Confocal

El microscopio confocal utilizado fue el TCS SP2 (Leica) dotado de 3 líneas de láser en el espectro visible (488, 543 y 633 nm.). La adquisición de imágenes se realizó empleando el programa informático LEICA Confocal Software versión 2.5™. Para el procesamiento final de las imágenes obtenidas se empleó Adobe Photoshop 8.0™. La videomicroscopía de lapso de tiempo se realizó registrando cada 10 segundos con el programa de LAS-AF de formación de imágenes adquiriendo 2-10 fotogramas por segundo. El cálculo de velocidades se realizó mediante la combinación de microscopía confocal y el programa de imágenes ImageJ.

## 6. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 6.1. Cepas bacterianas

DH5 $\alpha$  (ATCC 700790): cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) empleada de forma estándar para la obtención y conservación de los vectores empleados (Hanahan, 1983). Las cepas se cultivaron en medio LB (Duchefa) líquido con ampicilina (100 $\mu$ g/ml; Duchefa) a 37° C con agitación constante hasta alcanzar la DO a 600 nm deseada. La conservación de las cepas se realizó en medio LB con glicerol (Duchefa) al 15% y almacenadas a -80° C.

### 6.2. Transformación de cepas bacterianas

Se prepararon células competentes de las cepas bacterianas DH5 $\alpha$ , por el método de cloruro de rubidio (Sigma; Hanahan, 1983). Para la transformación de dichas células competentes con vectores plasmídicos (Tabla 4) se empleó el método de transformación por choque térmico (Studier, 1991).

Plásmido	Descripción	Procedencia
EGFP-B23	Vector codificante de la proteína nucleolar B23 con una intensificada proteína verde fluorescente	Proporcionado por la Dra. Carmen Rivas Centro Nacional de Biotecnología (Madrid)
EGFP-CD63	Vector codificante de un marcador de cuerpos multivesiculares con una intensificada proteína verde fluorescente	Proporcionado por el Dr. Jacques Neefjes Netherland Cancer Institute (NKI) (Holanda)
EGFP-Lamin B1	Vector codificante de la lámina nuclear B1 con una intensificada proteína verde fluorescente	Proporcionado por el Dr. Howard Worman Universidad de Columbia (EE.UU.)
EGFP-LBR	Vector codificante del receptor de la lámina nuclear B con una intensificada proteína verde fluorescente	Proporcionado por el Dr. Loren Fong UCLA (EE.UU.)
EGFP-Rab7	Vector codificante de un marcador de endosomas tardíos con una intensificada proteína verde fluorescente	Proporcionado por el Dr. Craig Roy Universidad de Yale (EE.UU.)
EGFP-tubulin	Vector codificante de tubulina con una intensificada proteína verde fluorescente	Clontech

**Tabla 4. Plásmidos.** Aquí se muestran los plásmidos utilizados así como su descripción y el laboratorio o casa comercial de procedencia.

### 6.3. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*

Un cultivo de 100 ml de células DH5 $\alpha$  transformadas con el vector de interés, era suficiente para la extracción y purificación del ADN plasmídico empleando Plasmid Midi Kit (Qiagen). La cuantificación y estimación de pureza del ADN obtenido se realizó midiendo absorbancia a 260 y 280nm en el espectrofotómetro Gene Quant I (Amersham Biosciences). Para la obtención de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* de menor volumen, se empleó QIAprep spin Mini Kit (Qiagen).

### 6.4. Transfección de células Vero

Las transfecciones se realizaron utilizando el reactivo de transfección TransIT 2020 de Mirus de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las células Vero se cultivaron en placas de cultivo tisular de 35 mm, en DMEM 5% de suero (1% de PS, 1% G), hasta 80% de confluencia. Por separado, 50 $\mu$ L de DMEM, suero y libre de antibióticos, se mezcló con 0.5 $\mu$ g de ADN y 1.5 $\mu$ L de TransIT 2020. La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente antes de la adición a las células. Para minimizar la citotoxicidad e incrementar la eficiencia de la transfección, el medio fue



reemplazado por células 300µl de suero fresco DMEM 5% y antibióticos libre antes de añadir la mezcla de ADN-tránsito. De manera similar, después de 4 h, la mezcla de transfección se retira de las células y 500 µl de suero de medio fresco 5% (1% de PS, 1% G) se añadió. A las 24 h después de la transfección, las células se incubaron con los péptidos o nanopartículas como se explicó anteriormente y se analizaron por microscopía confocal.

Inhibidor	Diana	Procedencia
Bafilomicina (100 nM)	Inhibidor específico de las ATPasas de H <sup>+</sup>	Sigma
Blebistatina (70 µM)	Inhibidor de Miosina II	Sigma
EGTA (3.5 mM)	Agente quelante del calcio	Sigma
Jasplakinolide (300 nM)	Inhibidor de la actina	Sigma
Latrunculina A (0.1 µM)	Inhibidor de la actina	Sigma
Nocodazole (2.5 µM)	Inhibidor de la polimerización de los microtúbulos	Sigma
Taxol (10 µM)	Agente estabilizante de microtúbulos	Sigma

**Tabla 5. Inhibidores.** Aquí se muestran las diferentes drogas utilizadas así como su nivel de actuación y su procedencia comercial.

## 7. ANÁLISIS DE CITOTOXICIDAD Y USO DE INHIBIDORES.

La viabilidad celular y los ensayos de proliferación se realizaron a concentraciones de 0-100 µM de péptido y 0-0.8 mg/ml de nanopartículas en células Vero mediante exclusión con azul de Tripán y ensayo CellTiter-Aqueous respectivamente (Promega). Una vez seguros de que la citotoxicidad no excediera el 10% de muerte celular después de la incubación de la droga a las concentraciones de trabajo indicadas. Las células fueron pretratadas durante 30 minutos con inhibidores (tabla 5) a las concentraciones indicadas en medio de cultivo durante 30 min a 37°C, e incubadas de nuevo con 10µM

DBPs o 0.2 mg/ml de NPs durante 1h y a 37°C y después se inició la adquisición de imágenes. Después de 2 horas, se reemplazó el medio de cultivo por medio nuevo y así se lavó durante una hora y después se adquirieron imágenes de nuevo.

## **8. CUANTIFICACIÓN DE FLUORESCENCIA**

Para cuantificar la acumulación intracelular de DBPs diferentes regiones citoplásmicas y de fondo fueron seleccionadas y la intensidad media de fluorescencia (IFM) cuantificada. Las MFIs finales se calcularon como se indica (región citoplasmática - fondo). El análisis cuantitativo de MFI se realizó con el programa de formación de imágenes Leica LAS-AF. Al menos treinta células de tres experimentos independientes fueron examinadas por cada tipo de péptido. El porcentaje de colocación entre dos fluorocromo se calcula de manera similar en las diferentes regiones citoplásmicas. Tres regiones citoplásmicas correspondientes a proyecciones celulares, lamelipodios, contactos célula-célula y no polarizados áreas de célula fueron estudiadas.

## **9. CUANTIFICACIÓN DE NANOTUBOS**

El análisis cuantitativo de los nanotubos se realizó con el programa de imágenes Leica LAS-AF. Treinta regiones al azar que contenían alrededor de tres células cada una fueron seleccionadas y los nanotubos cuantificados en células Vero teñidas con WGA 1:200 y se incubaron con los péptidos a 100um de 30, 60 y 120 minutos. Un control negativo de células Vero sin péptidos también se analizó para la comparación. Este procedimiento se llevó a cabo tres veces y los resultados se analizaron estadísticamente.

## **10. ANÁLISIS DE DATOS**

Una forma de análisis de varianza se realizó con el paquete estadístico GraphPad INSTAT. La corrección de Bonferroni se aplicó para comparaciones múltiples. Los datos se presentan como desviaciones estándar. Las diferencias entre cada una de las MFIs de los DBPs y el péptido control se consideraron estadísticamente significativas con un valor p de 0,001 ( $\alpha = 0,05$ ).



## **Resultados**

## **1. DISEÑO DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS CON CAPACIDAD DE ENTRADA EN LA CÉLULA.**

### **1.1. Diseño de péptidos que unen dineína (DBPs) y estudio de su penetración celular**

Varios virus utilizan el complejo motor microtubular en las primeras etapas de la infección. VPPA utiliza la proteína p54 para interactuar con la dineína y así moverse a través de los microtúbulos. Anteriormente se demostró por NMR que se producía una interacción de alta afinidad, y los residuos desapareciendo gradualmente fueron mapeados en DLC8 para definir una superficie de unión putativa de p54. Sobre la base de este análisis, se diseñó un conjunto de péptidos que representan el dominio de unión de la dineína. El potencial de estos péptidos dirigidos al dominio de unión para perturbar esta interacción proteína-proteína de alta afinidad se ensayó, y una secuencia de péptido corto se unía y competía con la proteína viral por la unión a dineína. Dada la complejidad y el número de proteínas implicadas en el transporte celular, la prevención de esta interacción viral-DLC8 podría no ser relevante para la infección viral con éxito. Por lo tanto, Se probó la capacidad de estos péptidos para interferir con la infección viral mediante la interrupción de la interacción con dineína viral p54. Con este enfoque, se presentaron unos péptidos cortos que inhibían el crecimiento viral (Hernaez et al., 2010; Martinez-Moreno et al., 2003). En esta tesis doctoral, el rastreo de secuencias peptídicas de origen viral o celular con conocida capacidad de unión a dineína en células vivas nos permitió observar las propiedades dinámicas ligadas a los motores microtubulares y el movimiento intracelular. Los virus utilizan para su propio beneficio los sistemas de transporte celular incluyendo la ruta endosomal (Hernaez and Alonso, 2010; Sieczkarski and Whittaker, 2003) y el citoesqueleto (Xiao and Samulski, 2012). Así de esta forma pueden atravesar la célula y alcanzar el núcleo celular para empezar la replicación y tener al final una progenie vírica para continuar con el proceso infectivo. Diversas familias de virus pueden unirse al complejo motor de la dineína para transportarse intracelularmente, como se ha demostrado en varios modelos virales (Alonso et al., 2001; Smith and Enquist, 2002) (Tabla 1). Para diseñar los ensayos de movilidad, en este trabajo hemos usado péptidos marcados con un fluoróforo cuya secuencia está basada en las secuencias de los dominios de unión a dineína de algunas de esas proteínas virales (Tabla 6).

PEPTIDO	SECUENCIA DE AA	REFERENCIA
DynPro	HPAEPGSTVTTQNTASQTMS	Smith <i>et al.</i> , 2002
ShortPro	YTTQNTASQTMS	Smith <i>et al.</i> , 2002
TransRb	FPNPSGRSSEDKSTQTAG	Hernández <i>et al.</i> , 2010
TransMy	PKDDKNTMTD	Raux <i>et al.</i> , 2000
Control IntCt	SLVSSDESVLHGSHESGEHV	Smith <i>et al.</i> , 2002
Control Poliarginina	RRRRRRRR	Bolhassani, 2011

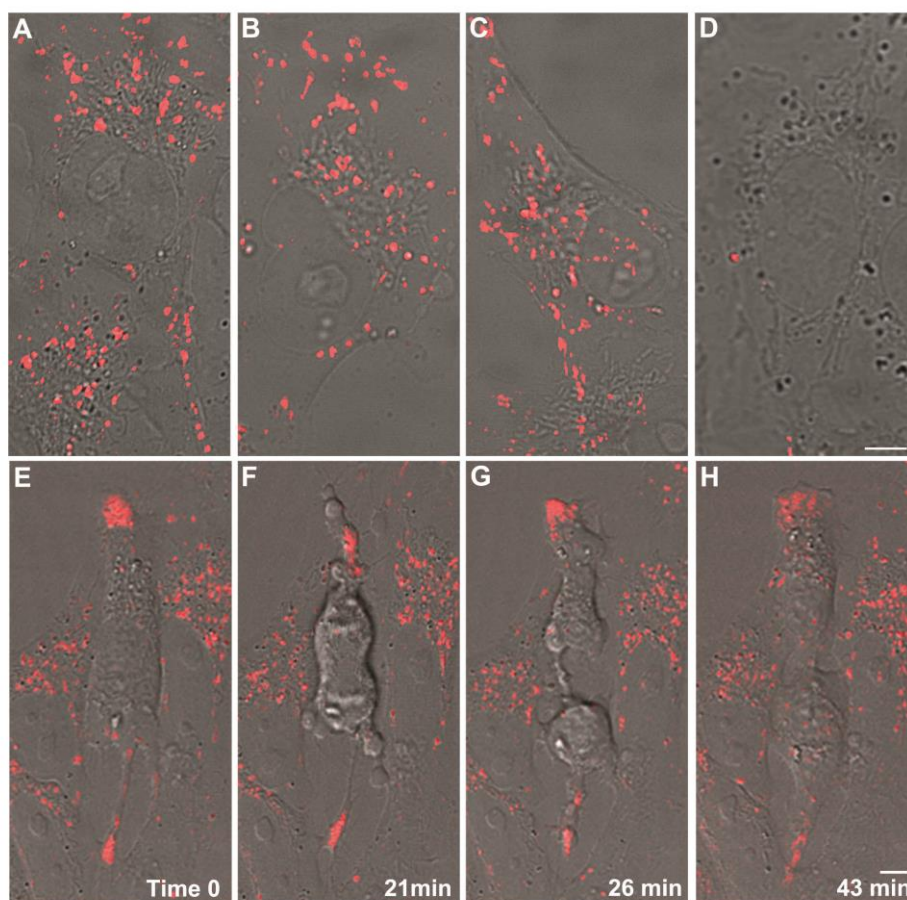
**Tabla 6. Diseño de secuencias peptídicas a partir de la secuencia de la proteína p54 de VPPA.** Estas secuencias se diseñaron a partir de la secuencia de la p54 (YTTVTTQNTASQT), proteína de VPPA y otras secuencias víricas con capacidad de unión a la cadena ligera de la dineína, DYNLL1. Se diseñó también un péptido control a partir de una secuencia de aminoácidos aleatoria (IntCt). Los péptidos se marcaron con carboxi-tetrametilrodamina (TAMRA; Genecust) con una cola de octa-arginina en el extremo carboxi-terminal.

Estas secuencias peptídicas, cuyo denominador común es la capacidad de unión al motor microtubular dineína, mostraron propiedades dinámicas, moviéndose activamente en el interior de las células y entre una célula y otra, como se muestra mediante el uso de videomicroscopía confocal a tiempo real (*time-lapse*) en células vivas (Figuras 1, 3). Las secuencias peptídicas utilizadas comprenden el dominio de unión a la cadena ligera de la dineína (*DYNLL1-binding domain*) de la proteína viral p54 del virus de la peste porcina africana (Hernaez et al., 2010) (DynPro; *Dynein-propelled*; Fig. 1 A), una secuencia acortada de la p54 basada en los aminoácidos críticos para la unión a dineína (ShortPro) y de la proteína P del virus de la rabia (Raux et al., 2000) (TransRb; Figura 1 B). Además se utilizó una secuencia de origen celular derivada de la miosina V (Martinez-Moreno et al., 2003) (TransMy; Figura 1 C) y finalmente, un control basado en una secuencia aleatoria de aminoácidos que no presenta unión a la dineína (IntCt; Figura 1 D). A todos los péptidos se añadió una cola de octaarginina para facilitar su entrada en la célula y además se marcaron con carboxitetrametilrodamina (TAMRA) para permitir su visualización mediante microscopía confocal.

### 1.1.1. Captación celular y distribución de los péptidos en el interior celular.

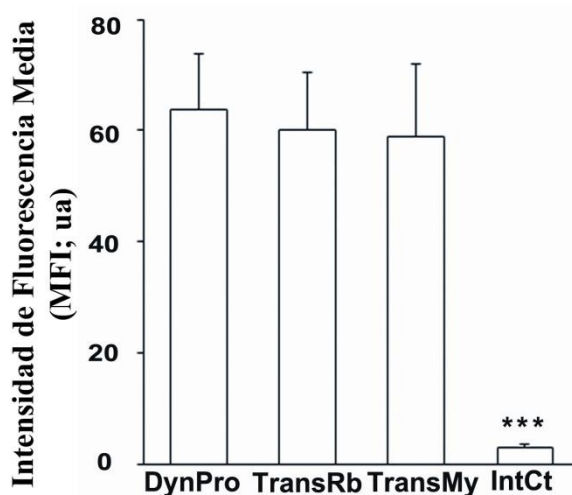
Los DBPs (péptidos de unión a dineína) presentaron una distribución y propiedades dinámicas muy similares (Figura 1A-C) y fueron eficientemente captados e introducidos en el interior celular en comparación con el péptido control (Figuras 1 D y 2,  $p < 0.001$ ; Video 1- anexo). Los DBPs se acumularon en el citoplasma celular de 5 a

15min después de su adición al medio celular y no se observaron diferencias significativas entre las distintas secuencias.



**Figura 1. Movimiento propulsado por DBPs en células vivas.** (A) Distribución intracelular de los DBPs extendiéndose por todo el citoplasma y el núcleo. La distribución subcelular y las propiedades dinámicas observadas fueron similares para todos los DBPs, que mostraron una dispersión rápida y notable acumulación dentro de las células en comparación con el péptido control. (D). Imágenes de células Vero incubadas 1 hora con 10 $\mu$ M de los siguientes péptidos marcados con rodamina: (A) DBP de origen viral Dynpro y (B) TransRb, (C) el dominio de unión a la dineína de la miosina V o TransMy y (D) el péptido control IntCt. (EH) Imágenes en vivo de la mitosis con la polarización de los péptidos después del ensamblaje del huso bipolar y la recuperación de la dispersión después de la citocinesis (H). Barra 10  $\mu$ m.

Por tanto, se comprobó que las secuencias de unión a dineína mejoraban significativamente la captación y acumulación celular respecto a la secuencia control.



**Figura 2. Captación celular de DBPs.** Intensidad de fluorescencia media (MFI) intracelular de DBPs marcados con TAMRA. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se calculó como se describe en el apartado de Materiales y Métodos y representa la media  $\pm$  desviación estándar (SD) medida en treinta células en tres experimentos independientes. El análisis de varianza se calculó como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Las diferencias de MFI entre cada DBP y el péptido de control fueron estadísticamente significativas con un p-valor de 0,0001 ( $\alpha = 0,05$ ). Por el contrario, las diferencias entre DBPs no fueron significativas con un p-valor de 0,3 ( $\alpha = 0,05$ ).

## 1.2. Transporte intracelular y transporte de célula a célula de los péptidos.

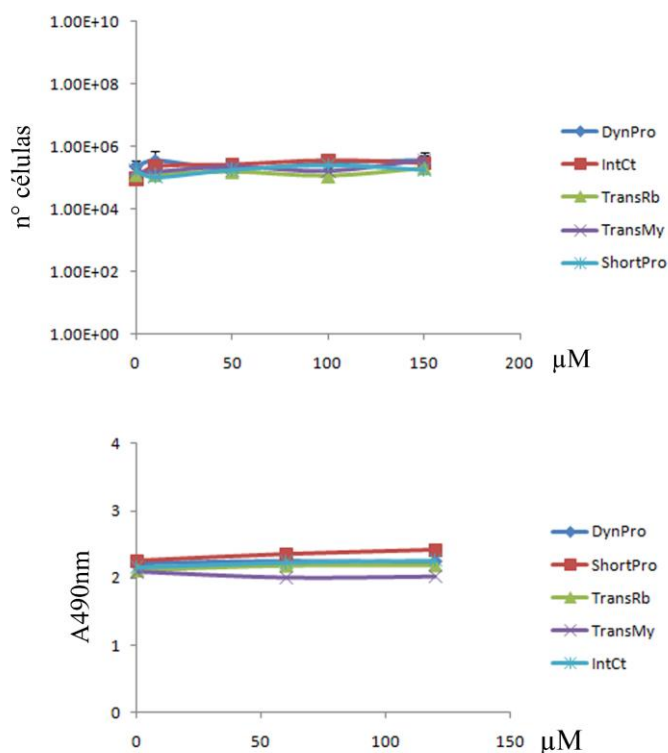
Utilizando videomicroscopía en tiempo real pudimos observar un movimiento intracelular muy activo de los péptidos, con pausas puntuales y alternancia de direcciones (Figuras 1,4). El movimiento de los DBPs en el citoplasma era característicamente bidireccional en repetidas series cortas de transporte anterógrado y retrógrado finalizando con largos recorridos hacia el córtex en áreas polarizadas del citoplasma (Figura 4 A). Con lo cual podemos concluir que los DBPs tienen una gran capacidad de acumulación y distribución intracelular gracias a este tipo de movimiento característico que les ayuda a superar las barreras citoplasmáticas.

### 1.2.1. Movimiento y acumulación en proyecciones celulares y nanotubos.

También observamos movimiento hacia las proyecciones celulares y transporte intercelular a lo largo de contactos célula-célula y nanotubos que resultaban en una rápida dispersión de los péptidos en el cultivo celular. Esta es la primera descripción de este eficiente movimiento, difusión y transmisión intercelular de una estructura peptídica propulsada por dineína. Además los microtúbulos se polarizan para orientar el huso durante la mitosis. En las células donde se observaba una división mitótica pudimos comprobar que los DBPs se polarizaban hacia el córtex y se agrupaban en los dos polos del huso mitótico (Figura 1E-G). Después de la citocinesis, los péptidos recuperaban su movimiento libre en el citoplasma (Figura 1 H). Tanto la morfología mitótica como la formación del huso mitótico se preservaban y el tratamiento de las células con DBPs no modificó ni la viabilidad ni la proliferación celular (figura 3). Los DBPs no alteran pues la biología de las células que llevan a cabo su ciclo de división



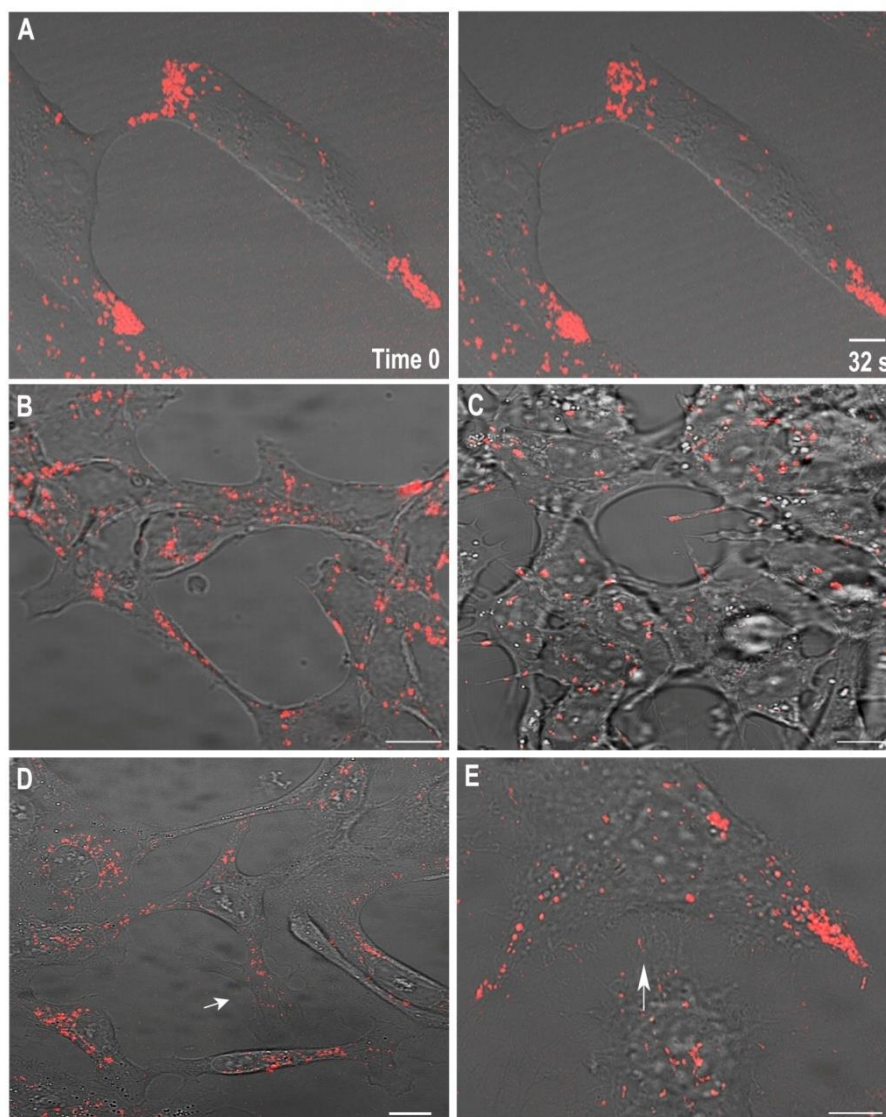
con normalidad. Así pues se demuestra que en los DBPs se observa un movimiento intercelular al observarse acumulación peptídica en proyecciones celulares.



**Figura 3. Análisis de citotoxicidad y proliferación celular.** La grafica superior muestra los niveles de citotoxicidad y proliferación celular producidos con la incubación en células Vero de los diferentes DBPs estudiados. No se observa una disminución significativa en el recuento o en la proliferación celular

### 1.3. Movimiento de los péptidos en diferentes líneas celulares.

Las propiedades dinámicas exhibidas por los DBPs fueron constantes en diferentes líneas celulares independientemente de la especie, origen tisular o estatus de transformación de las mismas. Testamos células Vero y otras líneas como COS-7, HEK293T/17, SK-N-MC, MDCK, HeLa, Tn5, y Sf21 (Figura 4). Asimismo, en todas ellas se pudo identificar la inducción de proyecciones de la membrana celular similares a nanotubos y la aparición de proyecciones celulares facilitando su distribución entre células.

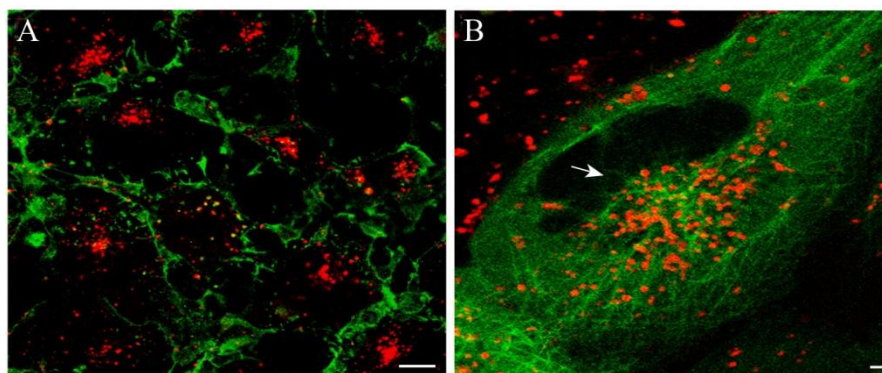


**Figura 4. DBPs se distribuyen a través de proyecciones celulares.** (A) Los péptidos se transportan activamente a través de proyecciones de membrana, para su propagación entre las células a través del cultivo celular. Imágenes a diferentes tiempos donde el Tiempo 0 representa 1 h de incubación mínima con 10  $\mu$ M Dynpro en células Vero, a partir del cual se comienza la filmación. (B, E) Los DBPs se dirigen hacia las extensiones celulares y proyecciones, acumulándose en lamelipodios a lo largo del tiempo (D, flecha) y filopodios (E, flecha). La distribución subcelular, la capacidad de transporte y en general, la dinámica del movimiento era similar en las distintas líneas celulares. (B) Distribución de péptidos en las células HEK293T (C) en las células de neuroblastoma humano SK-N-MC, (D) en células caninas MDCK y (E) en la línea celular de insecto H5. Todas las líneas celulares se incubaron con 10  $\mu$ M de Dynpro durante 1 h y se analizaron por microscopía confocal de imágenes *in vivo*. Bar 10  $\mu$ m.

Por lo tanto, de este estudio dinámico se pudo concluir que las secuencias peptídicas de unión a dineína, además de mejorar la captación intracelular de los péptidos en líneas celulares de origen diverso, confieren una determinadas propiedades de movilidad intracelular debidas a la función de esta proteína motora asociada a los microtúbulos.

### 1.3.1. Polarización celular y su relación con el transporte.

El empleo de videomicroscopía de células vivas, nos permitió observar que el movimiento presentaba características diferentes en células no polarizadas y polarizadas. En células no polarizadas, los péptidos siguieron un movimiento retrogrado de forma predominante y se acumulaban característicamente en el centro organizador de microtúbulos ó MTOC en la zona perinuclear (Fig. 5 A, B). En las células polarizadas, el movimiento predominante era dirigido hacia el extremo positivo (anterógrado) y se acumulaban en el córtex celular. Las células polarizadas presentan como es característico extensiones de la membrana plasmática, tanto protrusiones anchas laminares llamadas lamelipodios en los extremos celulares migratorios o proyecciones finas de tipo nanotubos o filopodios (Fig. 4 B, C, D, E). En la membrana de las células que presentan una migración activa, los DBPs tienden a acumularse en los bordes dirigentes, como el frente de movimiento de los lamelipodios o los extremos de los filopodios. También observamos movimiento y acúmulo de péptidos en las zonas corticales desde donde se proyectaban nanotubos.

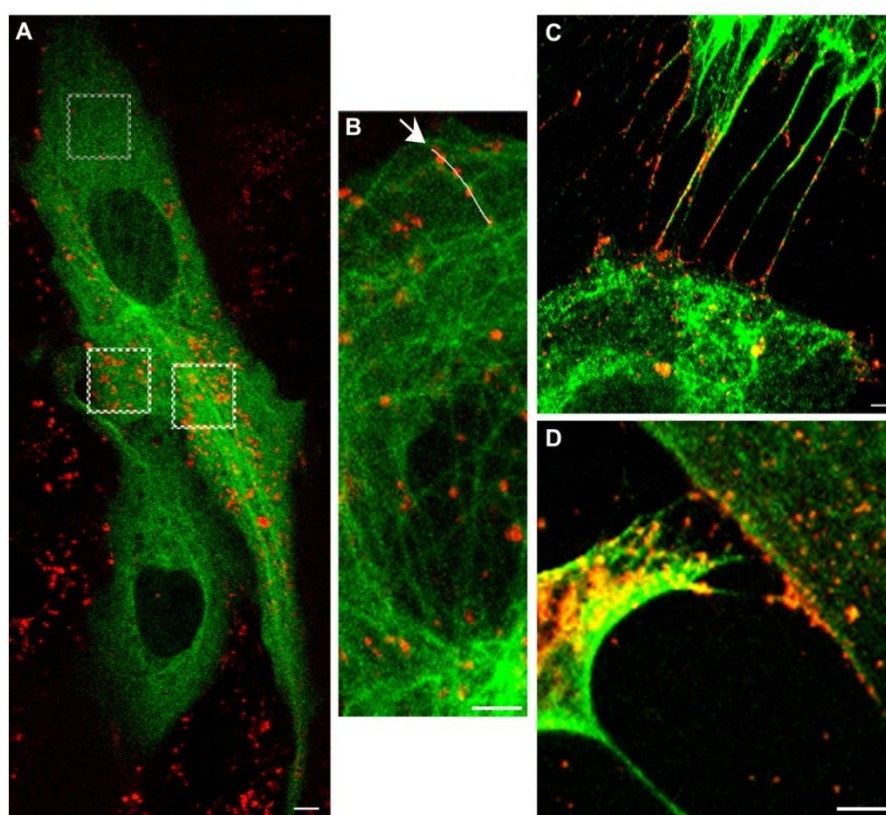


**Figura 5. Acumulación de DBPs en zona perinuclear (MTOC) en células no polarizadas.** (A) Acumulación de péptidos en la zona perinuclear (MTOC) en células COS-7 tratadas con 100  $\mu$ M del péptido Dynpro 1 hora, fijadas y teñidas con el marcador de lectinas de superficie, WGA. (B) Detalle de la acumulación y colocalización del péptido con los microtúbulos en la zona del MTOC en células Vero transfectadas con tubulina-GFP, incubadas con 100  $\mu$ M del péptido Dynpro y fijadas. Bar 10  $\mu$ m.

Por tanto, podemos concluir que los DBPs se desplazan a través del citoesqueleto hasta llegar a la zona del MTOC para acumularse en ella cuando la célula no está polarizada. Pero, tras una polarización celular que podría desembocar en la aproximación a una célula vecina, los DBPs se acumulan en los extremos celulares y en las proyecciones para mediante transporte intercelular alcanzar y distribuirse por otras células.

### 1.3.2. Colocalización de los péptidos con marcadores del citoesqueleto

Para definir la asociación de las secuencias peptídicas objeto de este estudio con estructuras del citoesqueleto celular, utilizamos un anticuerpo anti-dineína ( $\alpha$ -DYNLL1). Se observó colocalización entre las estructuras marcadas con dicho anticuerpo y el marcador fluorescente TAMRA unido a los péptidos preferentemente en las finas proyecciones celulares llamadas nanotubos y las áreas de formación de contactos (Figura 6 C, D). Para comprobar su colocalización con los microtúbulos se utilizaron células Vero transfectadas con GFP- $\alpha$ -tubulina. En células polarizadas, los péptidos se localizaban principalmente en lamelipodios y filopodios colocalizando con haces de microtúbulos; Figura 6 A, cuadros blancos y 6 B), al contrario de lo observado en regiones citoplásmicas no polarizadas en células (Figura 6 A, cuadros grises). En la Figura 6 A se muestran los porcentajes de colocalización entre TAMRA-DBP y tubulina-GFP calculados en distintas regiones citoplásmicas. En aquellas correspondientes a proyecciones celulares (cuadro inferior derecho: 43%), en lamelipodios (cuadro inferior izquierdo: 30%) y en regiones celulares no polarizadas (cuadro superior: 4%).



**Figura 6. Movimiento de péptidos hacia microtúbulos polarizados.** (A, B) En células polarizadas y asimétricas, los péptidos viajaban a lo largo de haces de microtúbulos estabilizados hacia una proyección celular (flecha). Células Vero transfectadas con tubulina-GFP, incubadas con 10  $\mu$ M DBP Dynpro y analizadas mediante imágenes in vivo.

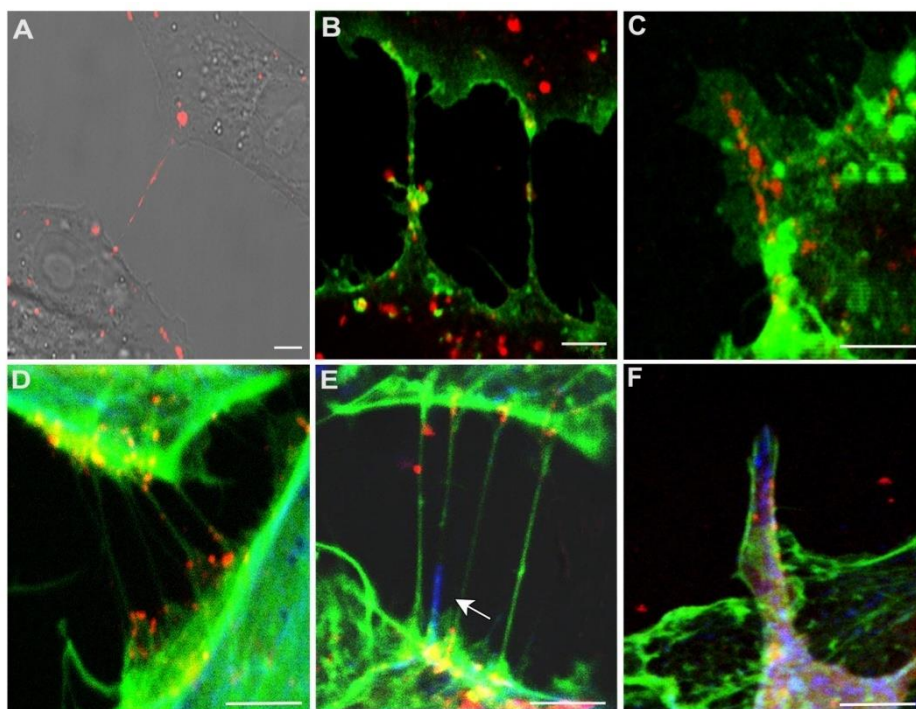
(A) Para cuantificar los porcentajes de colocalización entre DBPs-TAMRA y tubulina-GFP, se seleccionaron al azar regiones citoplásmicas correspondientes a proyecciones celulares (cuadro inferior derecho: 43%), en lamelipodios (cuadro inferior izquierdo: 30%) y en áreas celulares no polarizadas (cuadro en la parte superior: 4%) y se calcularon los porcentajes de colocalización. (B) Movimiento de los DBPs asociado a microtúbulos. (C,D) En las puntas de los filopodios y en finas conexiones célula-célula de tipo nanotubos, los DBPs colocalizaban con un anticuerpo anti-cadena ligera de la dineína (DYNLL1; porcentaje de colocalización de  $86 \pm 7$ ) revelado con un anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 488 en células Vero tratadas con 100  $\mu$ M Dynpro y fijadas. Barra 5  $\mu$ m.

Con esto, podemos asociar el movimiento de los DBPs a los microtúbulos y en concreto a la acción de la dineína que los péptidos reconocen específicamente y al unirse a ella les facilita el transporte a través del citoesqueleto celular.

## 2. TRANSPORTE CÉLULA-CÉLULA DE PÉPTIDOS A TRAVÉS DE NANOTUBOS

Analizamos detalladamente las proyecciones celulares en las que se observaba tráfico de péptidos de una célula a otra (Figura 7 C, D; video 2 - anexo). Encontramos conexiones finas y cortas de actina similares a los nanotubos (Figura 7 A, B, D, E; ca. 400 nm diámetro que parecían conectar con otras células permitiendo a los péptidos surfear en su superficie para alcanzar una célula cercana. Dichos nanotubos frecuentemente terminaban en un ensanchamiento ó bifurcación (Figura 6 C, D). Los nanotubos permiten el transporte de los péptidos entre células distantes (Figura 7 A) y pueden ser observados con un marcador de lectinas de superficie (*wheat germ agglutinin*; WGA), el cual se distribuye ampliamente sobre las membranas marcando las conexiones y uniones célula-célula (Figura 7 B). Asociados a los nanotubos finos de actina, también encontramos transporte de péptidos a través de proyecciones basadas en tubulina (microtúbulos) (Figura 7 C, F; >900 nm diámetro). Observamos la formación progresiva de proyecciones y tractos de microtúbulos en áreas celulares de contacto (Figura 7 C, F). La aparición de filamentos de tubulina acetilada se observó de forma paralela. La presencia de tubulina acetilada es una característica de estabilización de los microtúbulos (Figura 7E flecha, 7F). Así pues, podríamos decir que los DBPs activan por algún mecanismo la nucleación de actina por lo que se emiten proyecciones en forma de lamelipodios, filopodios y nanotubos que finalmente se convertirán en una proyección estable por la formación de tubulina y su posterior acetilación.

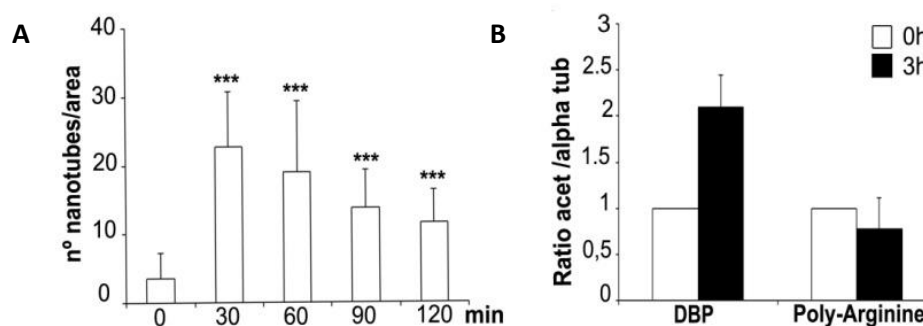




**Figura 7. Nanotubos formados por citoesqueleto e inducidos por DBPs.** (A, B, D, E) Imágenes correspondientes al transporte de los péptido fluorescentes a lo largo de finos y largos nanotubos que conectan células distantes. (A) Tráfico del péptido Dynpro a lo largo de un único nanotubo en una célula Vero (10  $\mu$ M Dynpro en células vivas) (B) Detalle de largos nanotubos con la membrana celular contrastada con WGA en células Vero fijadas. (C) Detalle del transporte de péptidos a lo largo de una ancha proyección en crecimiento en células Vero incubadas con 100  $\mu$ M Dynpro, fijadas y teñidas con WGA. (D) Las proyecciones más finas de tipo nanotubo de Células Vero teñidas con faloidina-Alexa 488 estaban formadas por actina. (E, F) Las proyecciones de microtúbulos se establecían de forma progresiva en las áreas de contacto entre células y en las proyecciones más gruesas. Inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -tubulina acetilada revelado con Alexa 647 en células Vero teñidas con faloidina-488. Barra 5  $\mu$ m.

### 2.1. Dinámica temporal de la formación de proyecciones celulares.

El número de nanotubos de actina aumentó significativamente durante los primeros 30 min después de la adición del péptido ( $p < 0.001$ ; Figura 7 A, 8 A).



**Figura 8. Aumento en el número de nanotubos de actina y acetilación de la tubulina promovido por el péptido Dynpro.** (A) Recuentos de nanotubos de actina a diferentes tiempos después de la adición del péptido,  $p < 0.001$  en

células Vero teñidas con WGA y fijadas. (B) Cuantificación de la tubulina acetilada por western blot en células Vero incubadas con Dynpro (y TransMy y TransRb no se muestra) o una cola de poli-arginina sola,  $p < 0,001$ .

También, la tubulina acetilada fue cuantificada por western blot a diferentes tiempos después de la adición del péptido y aumentó de 1 a 3 horas después de la adición del péptido (Figura 8 B). El aumento de la tubulina acetilada en las proyecciones coincidía con la disminución progresiva del número de nanotubos de actina después de 1 hora después de la incubación de los péptidos para ser sustituidos por proyecciones más gruesas (tubulina) (Figura 8 A). Por tanto se concluyó que el transporte célula-célula de péptidos estaba sustentado tanto por finos nanotubos basados en actina como por gruesas proyecciones basadas en tubulina (microtúbulos). Mientras que en los primeros 30 min después de la adición del péptido predominaban los nanotubos finos de actina, encontramos una formación progresiva de proyecciones celulares basadas estables en tubulina (microtúbulos).

Por lo tanto, se ha demostrado que los DBPs producen un aumento de proyecciones en forma de nanotubos de actina en las células. Esto sería una estrategia de distribución intercelular que se podría comparar a la de algunos virus.

## **2.2. Transporte de los péptidos bajo el efecto de agentes perturbadores del citoesqueleto**

Los resultados anteriores nos llevaron a comprobar si el transporte de los DBPs a través de las proyecciones celulares basadas en microtúbulos era dependiente de microtúbulos y sensible a las drogas despolimerizantes de microtúbulos.

### **2.1.1. Efecto del Nocodazol en el movimiento de los péptidos.**

El movimiento de los péptidos basado en el motor microtubular fue reversiblemente inhibido por drogas como el Nocodazol (Figura 9 A-C). En respuesta a esta droga, los péptidos se acumulaban alrededor del núcleo y detuvieron su movimiento y dispersión a lo largo del citoplasma, filopodios y proyecciones (Figura 9 B). Después del lavado y adición de medio nuevo, el movimiento se reactivaba y con él la dispersión de los péptidos se recuperaba rápidamente (Figura 9 C).

### **2.1.2. Efecto del Taxol en el movimiento de los péptidos.**

Cuando añadimos al cultivo Taxol, una droga antitumoral que estabiliza los microtúbulos impidiendo su despolimerización, el movimiento persistía a lo largo de los microtúbulos intracelulares estabilizados pero se observó una acumulación intracelular menos dinámica (Figura 10 A-C).

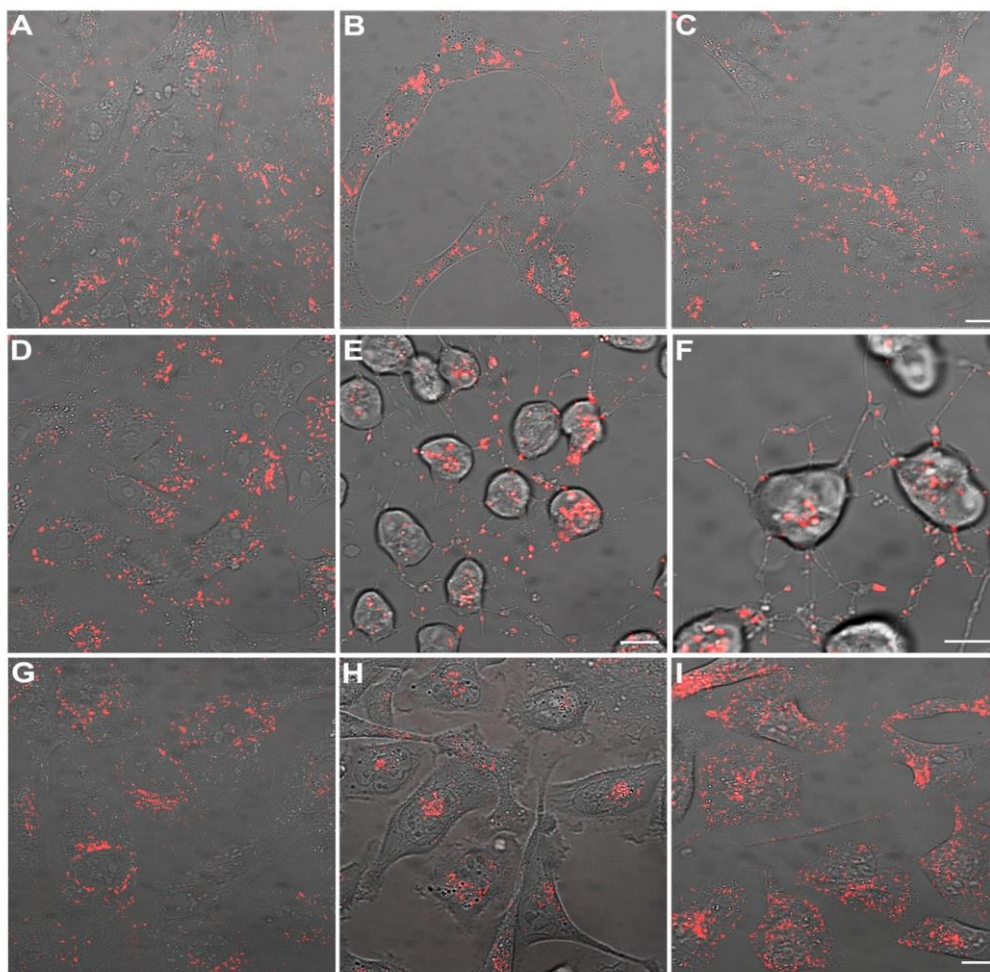
### **2.1.3. Efecto de drogas despolimerizantes de actina en el movimiento de los péptidos.**

Al contrario que con Nocodazol, las drogas que despolimerizan el citoesqueleto de actina, como la Latrunculina A y el Jasplakinolide, no impidieron el movimiento de los DBPs a lo largo de la célula y en proyecciones celulares (Figura 9 D-F, Figura 10 D-F y video 3 - anexo). Estas drogas causan el arrugamiento del citoesqueleto de actina, así pues las células se colapsan y redondean (Figura 9 E-F); sin embargo, muchas proyecciones celulares gruesas se mantuvieron conectando las células entre si y permitiendo que los péptidos continuasen viajando a lo largo de esos tubos. Este movimiento también persistía después del lavado (Figura 9 F). Sin embargo, bajo el efecto de agentes despolimerizantes de actina, no se observaban los nanotubos de actina o los filopodios finos de nueva formación. Un efecto similar a las drogas despolimerizantes de actina se obtuvo con Blebistatina, un inhibidor de la miosina II (Figura 10 G-I).

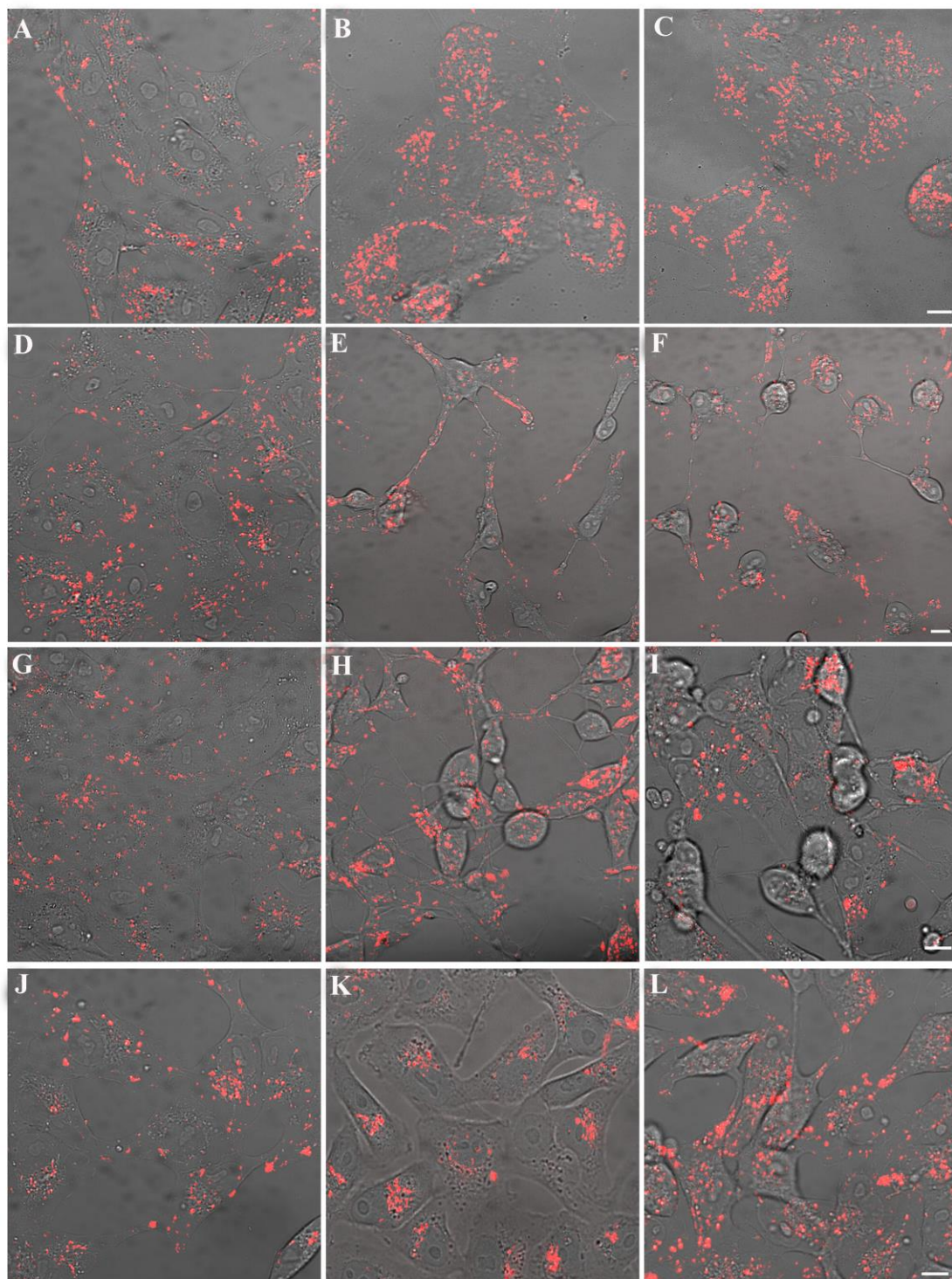
### **2.1.4. Efecto del EGTA en el movimiento de los péptidos.**

La disrupción de contactos célula-célula mediante el uso de EGTA (ácido etilenglicol tetracético), un agente quelante con una alta afinidad por el calcio; resultó en la pérdida del movimiento hacia la periferia y una marcada acumulación de los péptidos cerca del núcleo, zona perinuclear coincidente con el MTOC (Fig. 9 G-I en células MDCK y Fig. 10 J-L en células Vero) Después del lavado, los contactos célula-célula fueron restablecidos y el movimiento del péptido se recuperó y la difusión continuo (Figura 9 I, 10 I).





**Figura 9. Movimiento de los DBPs asociado a microtúbulos.** (A, D, G) Imágenes secuenciales muestran una dispersión del péptido antes del tratamiento con fármacos, (B, E, H) después de 1 h de incubación con las drogas, y (C, F, I) después del lavado en células Vero y MDCK. (B) El movimiento del péptido se detuvo por la adición de 2,5 mM Nocodazol; (C) después del lavado, el movimiento del péptido se recuperó y continuó propagándose. (EF) Drogas despolimerizantes de actina (como 0,1 mM de Latrunculina A) produjeron una contracción celular debido al colapso del citoesqueleto de actina y se observó la pérdida de los finos nanotubos de actina, pero el transporte péptido se conservaba dentro de las células y a través de las proyecciones de microtúbulos. (H) En células MDCK, la disrupción de los contactos intercelulares con 3,5 mM EGTA producía un bloqueo del movimiento del péptido hacia la periferia celular y este se acumulaba en la zona perinuclear (MTOC), (I) para después recuperarse con el lavado. Todas las muestras se analizaron mediante imágenes in vivo. Barra 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 10. Movimiento intracelular independiente de actina y paso de célula a célula.** Imágenes secuenciales que muestran la dispersión del péptido Dynpro a 10  $\mu$ M en células Vero en ausencia de fármacos (columna izquierda), después de la incubación con fármacos (columna central), y después de un lavado de 1 hora (columna a la derecha). (A-C) 10  $\mu$ M Taxol (D-F) 300 nM Jasplakinolide (G-I) 70  $\mu$ M Blebbistatina y (J-L) 3,5 mM EGTA. En contraste con el Nocodazol que detenía el movimiento, con Taxol el movimiento intracelular persistió a lo largo de microtúbulos estabilizados. Fármacos despolimerizantes de actina, tales como el Jasplakinolide, y también la Blebbistatina no impidieron el movimiento a lo largo de filopodios. El EGTA produjo la agrupación de los DBPs en el MTOC pero después del lavado, los contactos célula a célula se recuperaron y la difusión de los DBPs continuó. Bar 10  $\mu$ m.

Sobre la base de nuestros hallazgos concluimos que el movimiento de los DBPs en los nanotubos basados en microtúbulos y proyecciones es Nocodazol y Taxol-sensible; sin embargo, drogas despolimerizantes de actina no afectaron al movimiento una vez las conexiones célula-célula basadas en microtúbulos se hayan establecido. Esta serie de experimentos con drogas demostró que el movimiento de los péptidos a través de proyecciones celulares estables y gruesas era dependiente de microtúbulos. Por otro lado, la formación de nanotubos de actina inducidos por los péptidos sería sensible a drogas de despolimerización de actina y a los inhibidores de miosina II. Además contactos célula-célula deben ser importantes para dirigir la polaridad. Según estos resultados, la coordinación de los dos principales sistemas de citoesqueleto debe ser tan importante para el reparto celular de los péptidos como para el transporte de las cargas celulares.

### **3. TRANSPORTE AL NÚCLEO. CAPACIDAD DE LOS PÉPTIDOS DE ATRAVESAR LA ENVOLTURA NUCLEAR**

Los péptidos marcados fluorescentemente (DynPro marcado con TAMRA) se podían visualizar cruzando la envoltura nuclear, entrando en el núcleo y continuando su movimiento en el compartimento nuclear (Figura 11). Por lo tanto se analizó su relación con estructuras de la envoltura nuclear para estudiar su mecanismo de entrada en el núcleo.

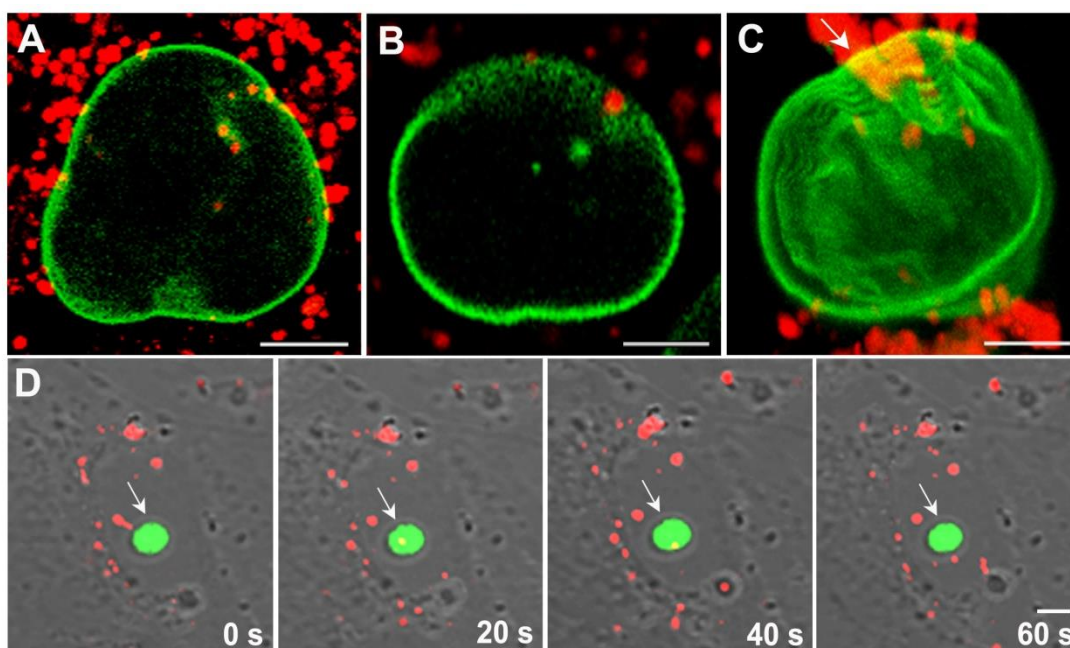
**3.1. Capacidad de DBPs para atravesar la lámina nuclear.** Los DBPs eran capaces de interaccionar con la envoltura nuclear de la lámina B1 desestabilizándola lo cual facilitaba su entrada en el núcleo. Esto se comprobó mediante la incubación de los DBPs en células Vero transfectadas con el plásmido EGFP-LBR expresando el receptor de lámina B1 (Figura 11A) y con el EGFP Lamin B1 marcando así la lámina B1 (Figura 11B). Se observaron acúmulos de DBPs junto a la membrana nuclear y en estos focos se observaba una deformación de la envoltura nuclear que se curvaba visiblemente. Así mediante videomicroscopía a tiempo real se pudo observar cómo se formaban invaginaciones y repliegues en la envoltura nuclear, inicialmente lineal. Finalmente se observaba que penetraban finalmente en el núcleo en dichas zonas de deformación de la lámina nuclear como se muestra en las secciones ecuatoriales y las reconstrucciones en 3D (Figura 11 B, C respectivamente). Una vez internalizados los DBPs la lámina recuperaba a su estado inicial.



### 3.2. Los DBPs alcanzan el nucléolo celular.

Los DBPs una vez internalizados en el núcleo celular se observaban en movimiento en trayectos cortos y también eran capaces de penetrar en el nucléolo donde péptidos colocalizaban con el marcador nucleolar B23-GFP nucleolina en su trayecto, sin afectar la morfología de la estructura nucleolar (Figura 11D).

Esta capacidad de penetración nuclear demostrada por los péptidos de unión a dineína podría tener como base la capacidad de la dineína de interaccionar dinámicamente con la envoltura nuclear y de ese modo dirigir el desmontaje de la lámina (Chen et al., 2007; Sherer et al., 2007). Esta es una función fisiológica de la dineína citoplásmica que ocurre en estadios tempranos de la mitosis.



**Fig. 11. Entrada de DBPs en el núcleo y nucléolo.** (A) Observamos un núcleo de célula Vero transfectada con un plásmido que expresa el receptor de la lámina B1-GFP (en verde) y los DBPs (en rojo) penetrando en el núcleo. (B) Célula Vero transfectada con un plásmido que expresa la lámina B1-GFP (en verde) y los DBPs (en rojo) penetrando en el núcleo. (C) En esta imagen en 3D se muestran un núcleo de célula Vero transfectada con un plásmido expresando lamina-GFP y los DBPs (rojo) produciendo pliegues en la lámina B1 (verde) al intentar penetrar el núcleo. (D) Se observan los DBPs (rojo) penetrando y saliendo del nucléolo (verde) en una célula Vero transfectada con un plásmido expresando B23 Nucleolina-GFP. Barra 5μm.

## 4. ENDOSOMAS Y TRANSPORTE DE LOS PÉPTIDOS

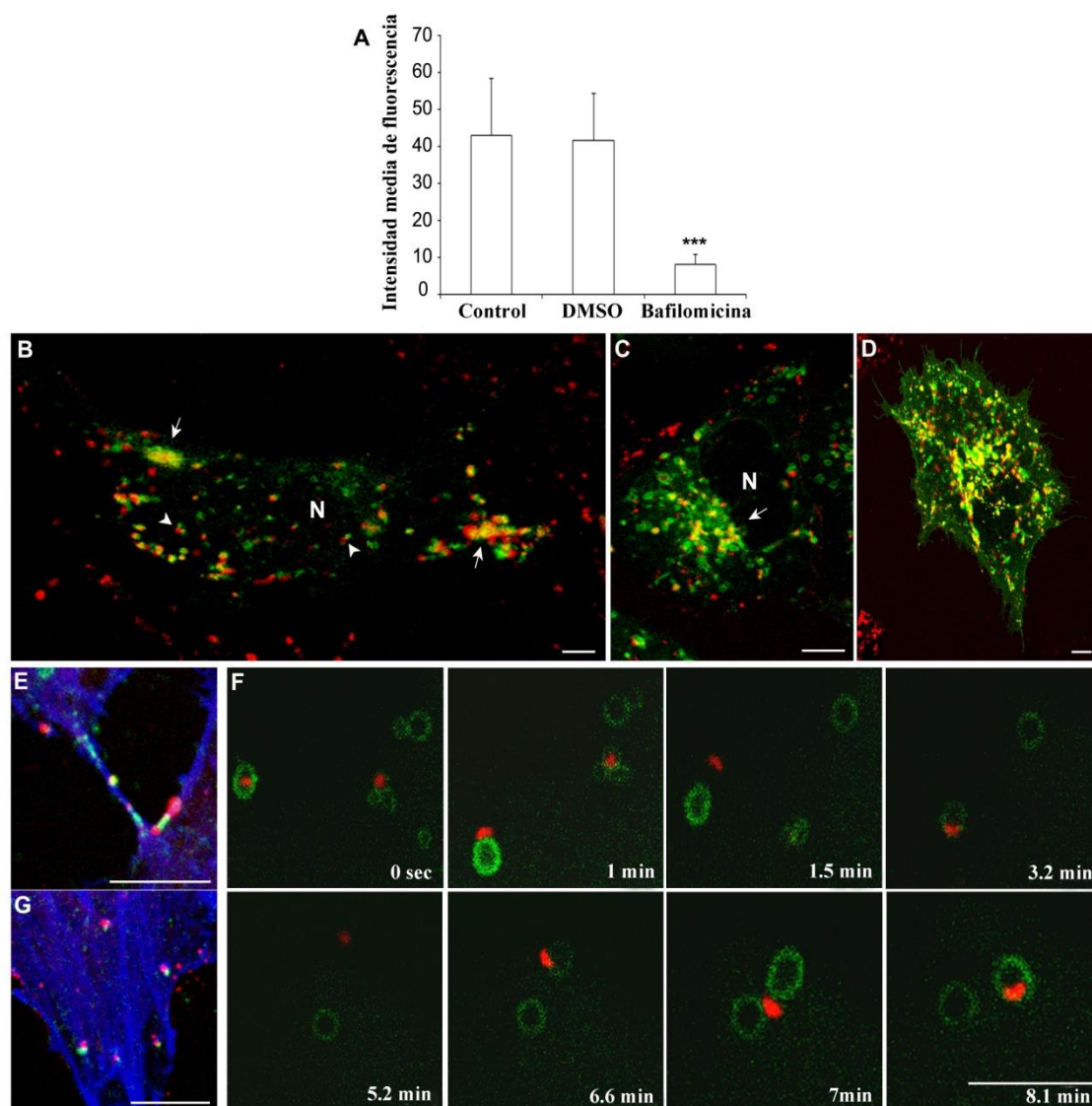
### 4.1. Entrada dependiente de energía y pH.

Posteriormente se realizó un análisis del mecanismo de captación celular de los péptidos. La entrada de los péptidos en las células demostró ser dependiente de energía y pH ya que se inhibía a 4°C de temperatura. Se utilizó una droga que impide la acidificación del endosoma por inhibir la ATPasa vacuolar, llamada Bafilomicina. El tratamiento con Bafilomicina inhibía la captación celular de los péptidos (Figura 12 A). Estos resultados sugieren fuertemente que la entrada de los péptidos se produce por endocitosis.

### 4.2. Colocalización con endosomas tardíos y cuerpos multivesiculares (MVBs).

La vía endocítica es utilizada por el VPPA para entrar en las células huésped después de la fijación inicial de los viriones a la superficie de la célula mediante receptores específicos. Además de atravesar el endosoma temprano, el virus continua por los distintos estadios madurativos de la vía endocítica. En concreto, los endosomas tardíos y la señalización asociada a los mismos, la GTPasa Rab7 que controla el transporte y la fusión de los endosomas tardíos, son esenciales para el éxito de la infección viral. Asimismo, los cuerpos multivesiculares (MVBs) que son estadios de maduración previos al endosoma tardío están directamente implicados en este proceso de infección viral (Cuesta-Geijo *et al.*, 2012). Además, la evolución de los endosomas en el interior de la célula está ligado a microtúbulos y a la unión de los propios endosomas al complejo motor microtubular. De tal foma que podrían moverse conjuntamente con los péptidos unidos al mencionado complejo motor. Por este motivo, se comprobó la asociación de los DBPs con estos endosomas. Para averiguar la asociación de los péptidos con endosomas tardíos, usamos un marcador de Rab7, y con los MVBs, usamos el marcador de CD63, (Figura 12 B-G). Tras la adición del péptido, los endosomas tardíos, normalmente dispersos por todo el citoplasma, se acumulaban tanto en la región perinuclear (MTOC), como en las regiones corticales de acumulación de los péptidos (Figura 12 B, C, D). Se observaban algunos péptidos en el interior de endosomas positivos para CD63 y Rab7 (Figura 12 B,C flechas) por ejemplo en el citoplasma y en nanotubos de conexión (Figura 12 E), pero también se observaban numerosos péptidos no contenidos dentro de endosomas y que mostraban un movimiento asociado a microtúbulos. De hecho, se podían observar péptidos o conjunto de péptidos marcados con TAMRA en proximidad o contacto con los endosomas sin

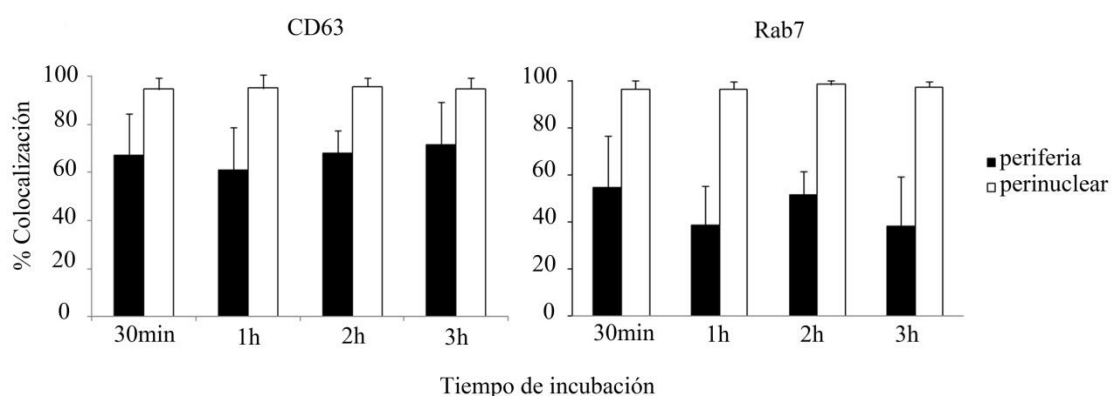
superposición directa (Figura 12 B, cabeza de flecha). En imágenes tomadas a tiempos sucesivos, se podía observar péptidos que entraban y salían de los endosomas así como movimiento individual de los péptidos seguidos por el movimiento de los endosomas (Figuras 12 F y video 4 - anexo). En conjunto, los resultados de estos experimentos sugieren que el movimiento asociado a endosomas podría ser seguido por los péptidos después de su entrada en la célula. Después del escape de los endosomas, su capacidad de unión a dineína puede permitir un movimiento independiente asociado a microtúbulos. Estos datos sugieren fuertemente que tanto la vía endocítica y los sistemas de transporte de citoesqueleto podrían estar involucrados a diferentes niveles en el transporte de los péptidos.



**Figura 12. Asociación con los endosomas de los DBPs.** (A) La captación celular de péptidos registrada con imágenes in vivo de microscopia confocal y medida como intensidad media de fluorescencia (MFI)

en células Vero pretratadas con DMSO, 100 nM de bafilomicina o sin tratamiento durante 30 min y después incubadas con 10  $\mu$ M TransMy.  $p < 0,001$ . (B, C) Colocalización de péptidos con endosomas tardíos analizada por imágenes in vivo en células Vero transfectadas con el plásmido Rab7-GFP después de 1 h de incubación con 10  $\mu$ M TransMy DBP. La colocalización total se muestra en amarillo en las áreas corticales del MTOC y en (B) y (C, flechas). Los péptidos en movimiento se encuentran con frecuencia en la proximidad de endosomas tardíos sin superposición directa (puntas de flecha). (C) Colocalización de péptidos con endosomas tardíos en el área del MTOC. (D) Colocalización de péptidos con cuerpos multivesiculares (MVBs) en células Vero transfectadas con el plásmido CD63-GFP analizadas con imágenes in vivo después de 1 h de incubación con 10  $\mu$ M TransMy. (E, G) Células Vero transfectadas con CD63-GFP fijadas y tenidas con faloidina-647 y después de 1 h de incubación con 100  $\mu$ M DBP TransMy. (F) Imágenes in vivo de péptido en movimiento seguido de endosomas tardíos en células Vero transfectadas con Rab7-GFP después de 1 h de incubación con 10  $\mu$ M TransMy. Barra 5  $\mu$ m.

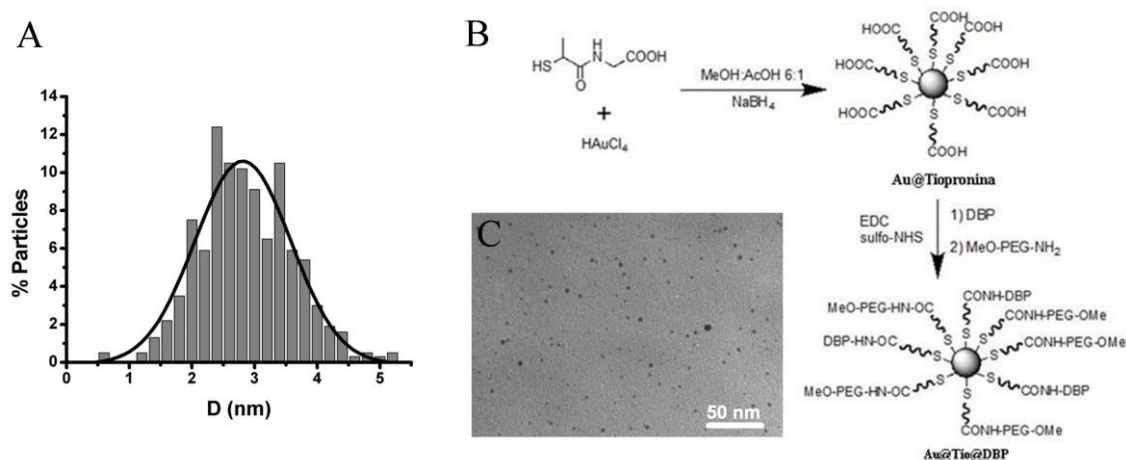
A continuación se analizó el porcentaje de colocalización de los péptidos con los endosomas tardíos y los cuerpos multivesiculares marcados mediante la transfección de los plásmidos EGFP-Rab7 y EGFP-CD63 respectivamente. Este análisis demostró un porcentaje de colocalización de los DBPs con los cuerpos multivesiculares entorno al 100% en la periferia celular y en cambio entre 60-80% en la zona perinuclear. En el caso de los endosomas tardíos, se observó un porcentaje de colocalización entorno al 100% en la periferia celular y en cambio entre 40-80% en la zona perinuclear. Estos resultados refuerzan la posibilidad de un escape endosomal por parte de los péptidos al alcanzar la zona perinuclear. De esta forma, seguirían su camino hacia el núcleo celular a través de los microtúbulos mediante su unión directa a la dineína (figura 13).



**Figura 13. Análisis de colocalización de DBPs con cuerpos multivesiculares y endosomas tardíos.** En la gráfica de la izquierda se observa el análisis de la colocalización de DBPs con cuerpos multivesiculares marcados con un marcador de CD63 y a la derecha con endosomas tardíos marcados con un marcador de Rab 7. Se distingue entre zona de periferia y perinuclear.

## 5. DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON PÉPTIDOS CON CAPACIDAD DE UNIÓN A DINEÍNA.

Presentamos la producción de nanopartículas de oro, estables y solubles en agua funcionalizadas con los péptidos que unen dineína (DBPs) (Tabla 6) como método altamente eficiente para la liberación y reparto de cargas. Las nanopartículas de oro de diferentes tamaños han sido ampliamente usadas debido a la ausencia de toxicidad y fácil eliminación vía renal. Esas nanopartículas se pueden fusionar a tiopronina para mejorar la estabilidad de la nanopartícula y prevenir la formación de agregados (Au@tiopronina) (Figura 14).



**Figura 14. Síntesis de Au@Tiopronina.** (A) UV / Vis de Au@Tiopronina (B) Esquema de síntesis de nanopartículas (C) TEM de nanopartículas de 2nm (colaboración con el Dr. JM de la Fuente del Instituto de Nanociencia de Aragón).

### 5.1. Síntesis de nanopartículas Au@Tiopronina (2nm).

Para la síntesis de las nanopartículas, nanopartículas Au@tiopronina se prepararon usando el procedimiento de Murray (Templeton et al., 2000). Estas nanopartículas consisten en pequeños grupos de oro estabilizados con el aminoácido no natural tiopronina (*N*-2-mercaptopropionilglicina). La tiopronina tiene un grupo  $\text{--CO}_2\text{H}$  terminal libre que permite la funcionalización de las nanopartículas de oro con las secuencias peptídicas. La reacción fue llevada a cabo en una mezcla ácida metanólica/acética. La codisolución de HAuCl<sub>4</sub> y tiopronina dio como resultado una solución estable. Las condiciones ácidas en este punto son muy importantes para garantizar la protonación de los grupos carboxílicos de la tiopronina, y para proporcionar una eficiente y densa monocapa autoensamblante de tiopronina que protege las nanopartículas de oro. La adición del reductor NaBH<sub>4</sub> proporcionó una



solución oscura debido a la reducción de la sal de oro y la formación de las nanopartículas. Las nanopartículas obtenidas eran solubles en agua y estables en condiciones fisiológicas. El exceso de tiopronina y sales fue purificado por diálisis y caracterizado por UV/Vis y TEM (Figura 14). Las imágenes del TEM mostraron un diámetro medio de 2.8nm para el núcleo de oro de las nanopartículas Au@tiopronina. En espectro de absorción UV/Vis, la banda de plasmones de superficie (SPB) es prácticamente indetectable como consecuencia del pequeño tamaño de estas nanopartículas.

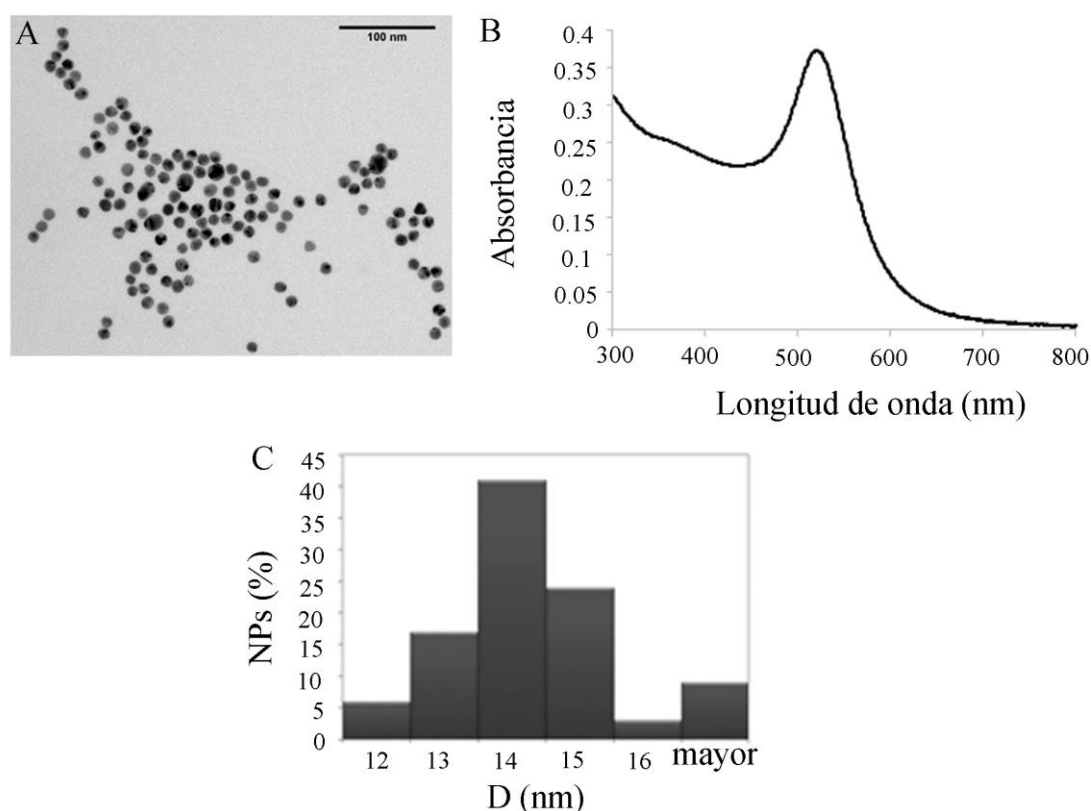
#### **5.1.1. Funcionalización de Au@tiopronina mediante Química de Carbodiimida.**

Usando la reactividad del grupo carboxílico de la tiopronina, funcionalización adicional con moléculas aminadas se llevó a cabo usando el procedimiento descrito por (de la Fuente and Berry, 2005) (Figura 14):

- 1) Un derivado del polietilenglicol aminado ( $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$ ),
- 2) diferentes secuencias peptídicas y
- 3) marcador fluorescente 5-TAMRA-cadaverine.

Moléculas PEG fueron elegidas para mejorar la estabilidad de las nanopartículas en el medio de cultivo celular y evitar interacciones inespecíficas. Una densa capa de PEG confiere hidrofiliidad a los nanomateriales, así pues aumentando su solubilidad en agua, pero este polímero también previene interacciones inespecíficas con otras moléculas (Storm et al., 1995). Los péptidos seleccionados son las secuencias previamente descritas que abarcan el dominio de unión a la dineína de la proteína viral p54 del virus de la peste porcina africana (Hernaez et al., 2010) ; DynPro; *Dynein-propelled*), y una secuencia más corta de la p54 basada en los aminoácidos críticos para la unión (ShortPro). Como control, se eligió la secuencia aminoacídica aleatoria que no une dineína (IntCt) (Tabla 6). Para garantizar una adecuada presentación de los péptidos y minimizar el impedimento estérico debido a un denso empaquetamiento de moléculas en la superficie de las nanopartículas, se añadió una cola de tetraglicina, a continuación de un residuo de lisina. Los grupos amino funcionales primarios de esta lisina fueron utilizados para el marcaje fluorescente de los péptidos con carboxitetrametilrodamina (TAMRA). Finalmente, se añadió una cola de octaarginina al extremo de estos péptidos para aumentar la carga positiva del péptido y mejorar la

captación celular (Figura 14). También se utilizaron nanopartículas de oro no funcionalizadas con los péptidos, marcadas asimismo con 5-TAMRA cadaverina como otro control. Esta reacción utiliza el carbodiimida N-[3-(dimetilamino)propil]-N'-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC), que es soluble en agua, para catalizar reacciones (formación de enlace amida) entre los grupos carboxílicos de las nanopartículas y los grupos amino del PEG, los péptidos o del 5-TAMRA cadaverina. Se incluyó sulfo-N-hidroxisuccinimida en la mezcla de reacción para mejorar la eficiencia de la reacción de formación de la amida mediada por carbodiimida mediante la producción de intermediarios estéricos activos de reacción resistentes a la hidrólisis. Las nanopartículas resultantes fueron analizadas por potencial Zeta, UV/Vis y fluorescencia, mostrando las moléculas que fueron incorporadas a las nanopartículas y la ausencia de agregados del clúster después del acoplamiento del péptido (Figura 14).



**Figura 15. Síntesis de Au14@PEG.** (A) TEM de nanopartículas de Au14@PEG (B) Esquema de síntesis de nanopartículas, (C) UV / Vis (colaboración con el Dr. JM de la Fuente del Instituto de Nanociencia de Aragón).

## 5.2. Síntesis de nanopartículas Au14@PEG (14nm).

Nanopartículas de oro recubiertas con citrato con un diámetro medio de ~ 14 nm fueron sintetizadas por el método de reducción citrato descrito por Lee y Meisel (Lee and Meisel, 1982)). Estas NPs presentan una gran estabilidad, biocompatibilidad y funcionalidad química debido a que poseen un recubrimiento de PEG densamente empaquetado. De forma complementaria un espaciador carboxilado proporciona a las NPs radicales libres para la unión covalente de moléculas, que en este caso fueron los DBPs, a través de la química de la carbodiimida para la funcionalización de las NPs en el interior celular. Una vez ajustado el pH e incubadas toda la noche para favorecer el intercambio de ligando, centrifugadas y resuspendidas las NPs se caracterizaron por TEM, UV-Vis y potencial-Z (-40 mV a pH 6,5). El espectro UV-Vis de las NPs mostraba la típica banda de plasmón centrada en 519nm (Figura 15).

### 5.2.1 Funcionalización de Au14@PEG mediante Química de Carbodiimida.

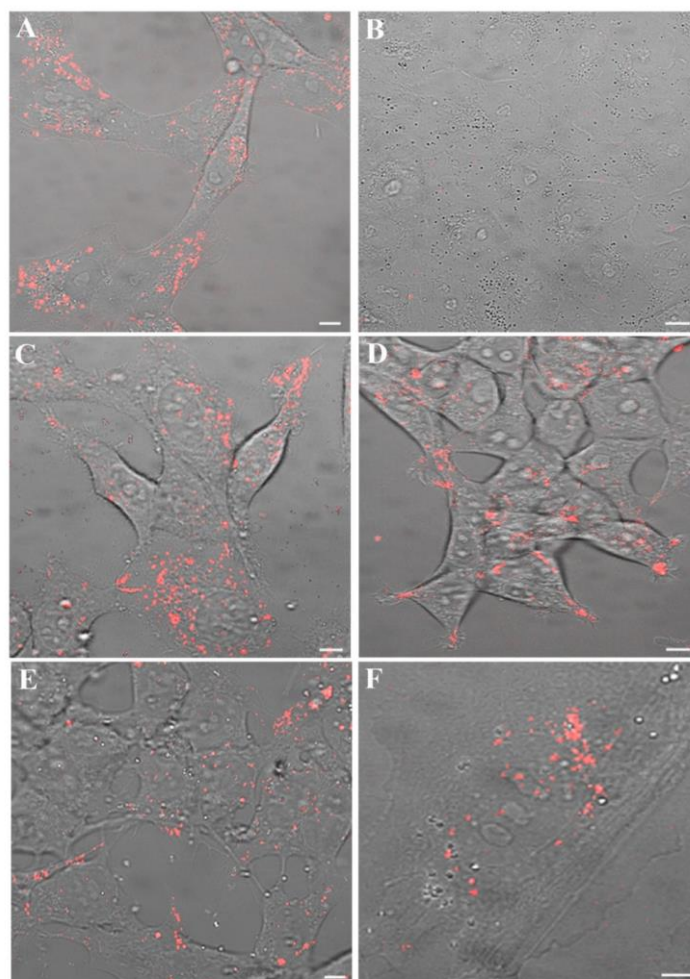
Au14NPs fueron derivatizadas con diferentes moléculas aminadas, como los péptidos etiquetados con TAMRA y moléculas de PEG cortas ( $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$ , 750Da de *Rapp-polymere*) para la función celular y la reducción de la interacción con las proteínas del plasma (interacciones inespecíficas). Brevemente, 2 mg (aprox. 120 pmol) de Au14NPs se incubaron con 1:2 mg de EDC:Sulfo-NHS en 2 ml de tampón MES pH 6.5 durante 20 min a 37 ° C; a continuación, las Au14NPs activadas (teniendo un éster reactivo con amina semiestable) se incubaron durante 2 h, a temperatura ambiente, con diferentes péptidos (se añadieron aprox. 30 péptidos por NP, 3.6 nmol), en este caso con DynPro, TransRb, TransMy e IntCt. Finalmente, 1 mg de  $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$  (1.35  $\mu\text{mol}$ , un gran exceso molar) se añadió para derivatizar los grupos carboxílicos activados restantes. Las Au14NPs derivatizadas se mantuvieron bajo condiciones de agitación suave durante la noche; NPs funcionales fueron lavadas de exceso de ligando por precipitación centrífuga. Las mediciones de fluorescencia de los sobrenadantes de todas las NPs confirmaron que todos los péptidos se habían unido correctamente a ellas. NPRs funcionales se centrifugaron dos veces durante 30 min a 14.000 rpm, y luego los pellets se resuspendieron primero en agua Milli-Q y, finalmente, en 50 mM MES, pH 6.5. El acoplamiento eficaz de las diferentes secuencias de péptidos fue confirmada por mediciones de fluorescencia de las diferentes muestras (también, los sobrenadantes no mostraron ninguna señal de fluorescencia). El espectro UV-Vis se mantuvo igual para todas las muestras de NPs PEGiladas y PEGiladas y derivatizadas con diferentes péptidos. Los valores de potencial Z de todas las muestras derivatizadas eran muy

parecidos al de las muestras simplemente PEGiladas (-10mV) que eran derivatizadas con exceso de PEG aminado corto (como se hizo para todas las otras muestras). Hay que tener en cuenta que sólo aprox. 2,5% de los grupos carboxílicos libres fueron también objeto de acoplamiento de péptidos. Esto debería tener un impacto muy bajo (dentro de los errores) en los valores de Z-potenciales, a menos que las moléculas adjuntadas sean comparables en tamaño con las NPs. Aquí, los péptidos son secuencias cortas agregadas en una pequeña proporción de NP (30:1) que no puede cambiar drásticamente el potencial Z de las NPs.

## **6. INTERNALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS Y SUS PROPIEDADES DINAMICAS.**

### **6.1. Captación celular de las NPs.**

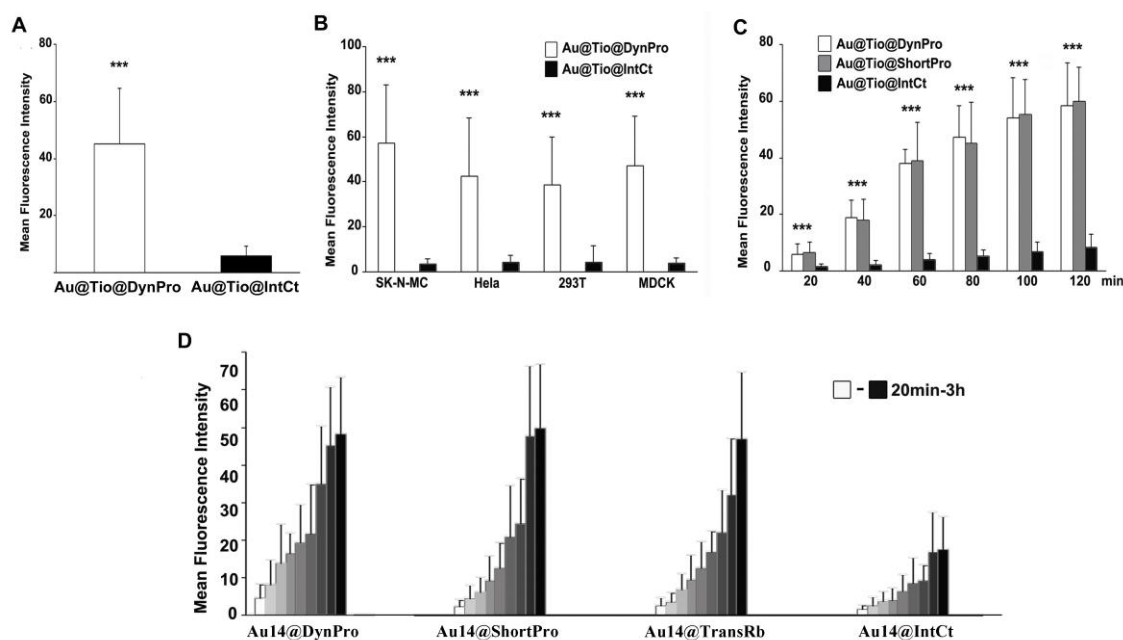
La captación celular de las nanopartículas Au@tiopronina o Au@ modificadas con DBPs (Au@Tio@DBPs y Au@DBPs respectivamente) fue significativamente más eficiente en comparación con aquellas funcionalizadas con el péptido control en células Vero (fibroblastos de riñón de mono) ( $p < 0.001$ ; Figura 16A). Se obtuvieron resultados similares usando otras líneas celulares como la línea celular de neuroblastoma SK-N-MC, la línea celular epitelial MDCK, una línea derivada de un carcinoma uterino HeLa y una línea celular embrionaria transformada de riñón humano 293T (Figura 16 y Figura 17 B). Las nanopartículas presentaron una gran acumulación intracelular creciente con el tiempo entre 20-120 min tras su adición al cultivo.



**Figura 16. Entrada y captación de NPs (de 2 nm) en diferentes tipos celulares.** (A) Campo microscópico representativo de células Vero incubadas con Au@Tio@Dynpro y (B) Au@Tio@IntCt. (EH) Campos microscópicos representativos de células HeLa (C), 293T (D), SK-N-MC (E) y células MDCK incubadas con Au@Tio@Dynpro (F). Estos experimentos fueron realizados también con NPs de 13nm (Au@DBPs) obteniendo la misma acumulación intracelular y en los diferentes tipos celulares estudiados. Bar 10  $\mu$ m.

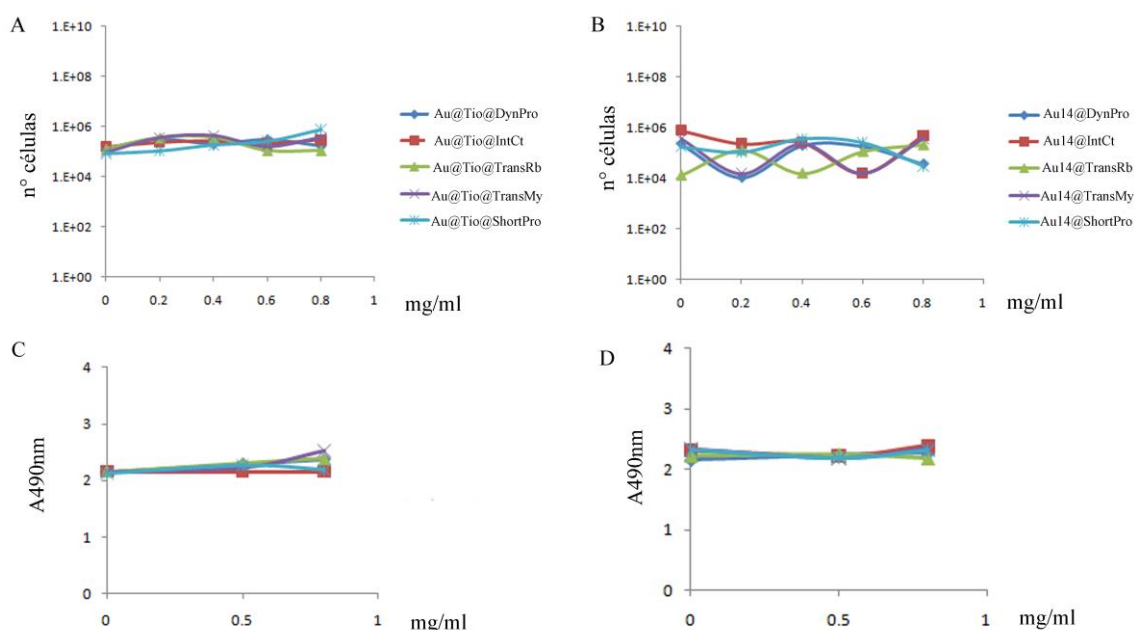
Esta acumulación característica fue similar para las nanopartículas modificadas con los diferentes tipos de péptidos con capacidad de unión a dineína, pero mayor que la de las nanopartículas modificadas con el péptido control (Figura 17C). Las nanopartículas eran internalizadas rápidamente y se distribuían ampliamente dentro de la célula y a lo largo todas las células del cultivo en el rango de tiempo mencionado. La modificación con PEG aumentaba la estabilidad de las nanopartículas en medio de cultivo celular y no modificó significativamente la captación de NPs. Para estos experimentos las células

fueron incubadas con 0.2 mg/ml de nanopartículas durante 1 hora, excepto cuando se indica más abajo.



**Figura 17. Captación celular de las nanopartículas modificadas con DBPs.** (A) La intensidad media de fluorescencia (MFI) intracelular de DBPs a 10 $\mu$ M marcados con TAMRA después de 1 hora de incubación en células Vero y (B) otros tipos celulares. (C) MFI en función del tiempo de acumulación de Au@ DBPs, a diferentes tiempos entre 20-120 min en células Vero. (D) MFI en función del tiempo de acumulación de NPs Au14@DBPs de 14nm a diferentes tiempos entre 20-120 min en células Vero. Las diferencias entre las MFIs de cada DBP en comparación con el péptido control fueron estadísticamente significativas con un p-valor de 0,001 ( $\alpha = 0,05$ ). Sin embargo, las diferencias entre los DBPs no fueron significativas con un p-valor de 0,3 ( $\alpha = 0,05$ ).

Por tanto, podemos afirmar que las NPs, tanto las de menor tamaño (2nm) como las de mayor (14 nm), funcionalizadas con los DBPs adquieren la misma capacidad de entrada, acumulación y dispersión intracelular que ellos, mostrando así unas excelentes cualidades para ser posibles transportadoras de sustancias en terapia celular. Así pues a pesar del buen estado de las células visualmente apreciable decidimos testar de formas estandarizada la citotoxicidad y proliferación celular de las NPs así como lo hicimos previamente con los DBPs obteniendo resultados positivos ya que la incubación de concentraciones muy superiores a la concentración usada en nuestros experimentos no afectaba la viabilidad celular manteniendo así pues el recuento y la proliferación celular (Figura 18).

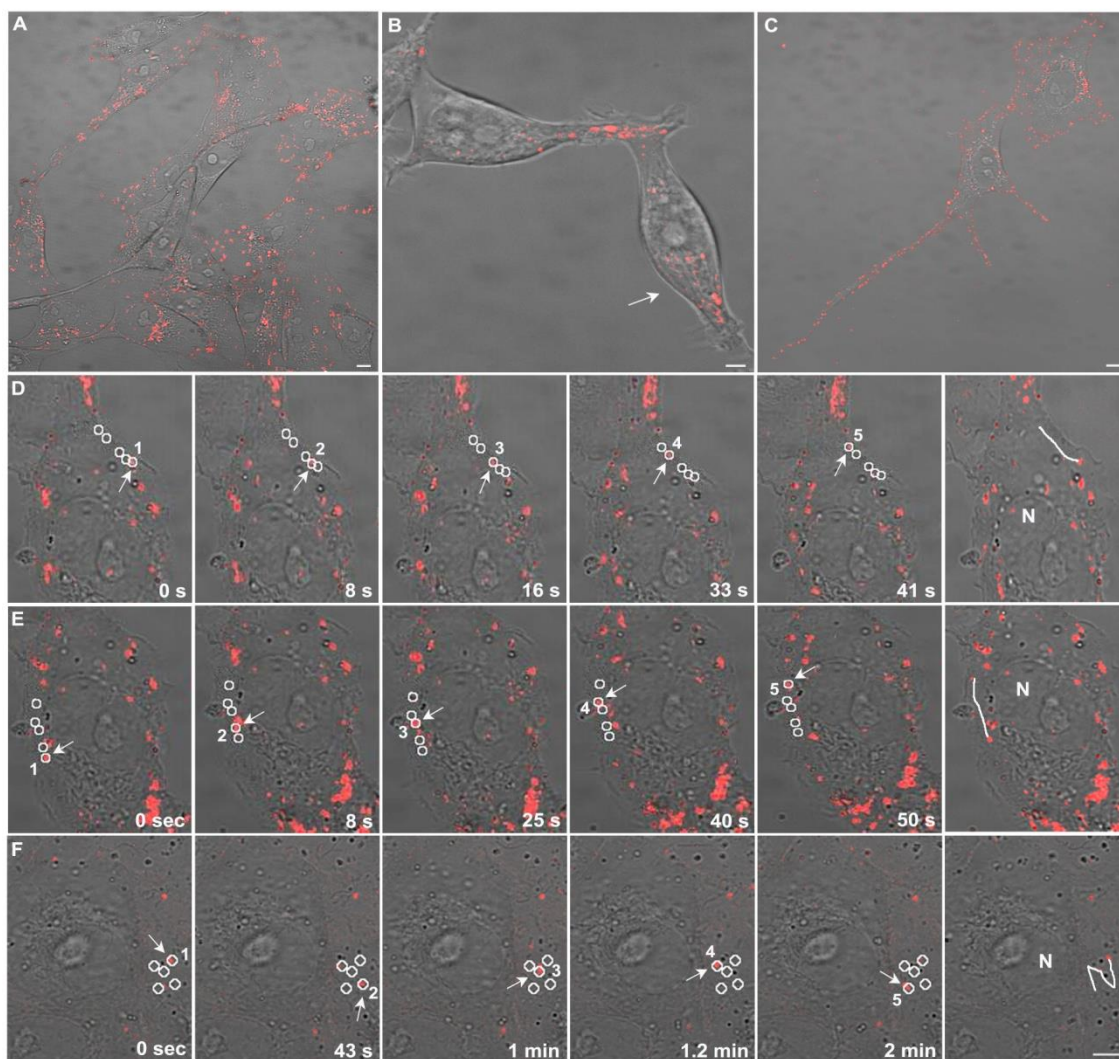


**Figura 18. Análisis de citotoxicidad y proliferación celular.** En esta gráfica se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad y proliferación celular en células Vero incubadas con Au@Tio@DBPs y Au14@DBPs. Ninguno de los dos parámetros presentaba una disminución significativa.

## 6.2. Propiedades dinámicas de las nanopartículas (NPs).

Las propiedades dinámicas de las nanopartículas se estudiaron mediante videomicroscopía a tiempo real. Así, se observaba que dentro de las células las nanopartículas Au@Tio@DBPs o Au14@DBPs eran móviles, con un movimiento bidireccional de a lo largo del citosol. Además se observaba un flujo continuo hacia las proyecciones celulares bombeando las NPs funcionalizadas hacia las células vecinas o distantes. Es decir, observamos movimiento bidireccional hacia la periferia celular, hacia las proyecciones celulares y el transporte intercelular de las nanopartículas entre células (Figura 19 A-C). No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tipos de Au@Tio@DBPs estudiados en cuanto a distribución y propiedades dinámicas, siendo las descritas aplicables a todas ellas (no mostrado). El movimiento de las NPs era de velocidad más alta (velocidad media =  $0.4 \pm \text{SD } 0.1 \mu\text{m/s}$ ) en comparación a las NPs funcionalizadas con el péptido control IntCt ( $0.2 \pm \text{SD } 0.1 \mu\text{m/s}$ ). Este movimiento seguía trayectorias lineales permitiendo la progresión de las nanopartículas funcionalizadas con DBPs (Figura 19D-E), a diferencia del movimiento de aquellas funcionalizadas con el péptido control que no era progresivo y ni lineal (Figura 19F).





**Figura 19. Transporte y progresión lineal de NPs a través de proyecciones celulares.** Imágenes representativas de microscopía confocal en células (A) Vero (B) HEK293T y (C) MDCK, mostrando la extensa dispersión de nanopartículas por el cultivo. Ejemplo del transporte de Au@Tio@DBPs a través de proyecciones (B) cortas o (C) largas. (D, E) Imágenes representativas a diferentes tiempos de la progresión lineal de Au@Tio@DBPs dentro de la célula (círculos) y las trayectorias resultantes. (F) Comparación con el movimiento no lineal registrado con las NPs control Au@Tio@Intct. (A-F) Estos experimentos fueron llevados a cabo con las Au14@DBPs (de 14 nm) obteniendo idénticos resultados. Bar 5  $\mu$ m.

Así pues, el movimiento de las NPs se ve visiblemente mejorado por la funcionalización con los DBPs. La capacidad de transportarse intercelularmente y de recorrer tramos rectos y no arbitrarios, hacen de ellas un posible transportador de sustancias preciso y rápido.

### 6.3. Transporte de las nanopartículas dependiente de microtúbulos

El movimiento lineal de las nanopartículas modificadas con DBPs sugería un transporte dependiente de microtúbulos. Durante los primeros minutos después de la incubación,



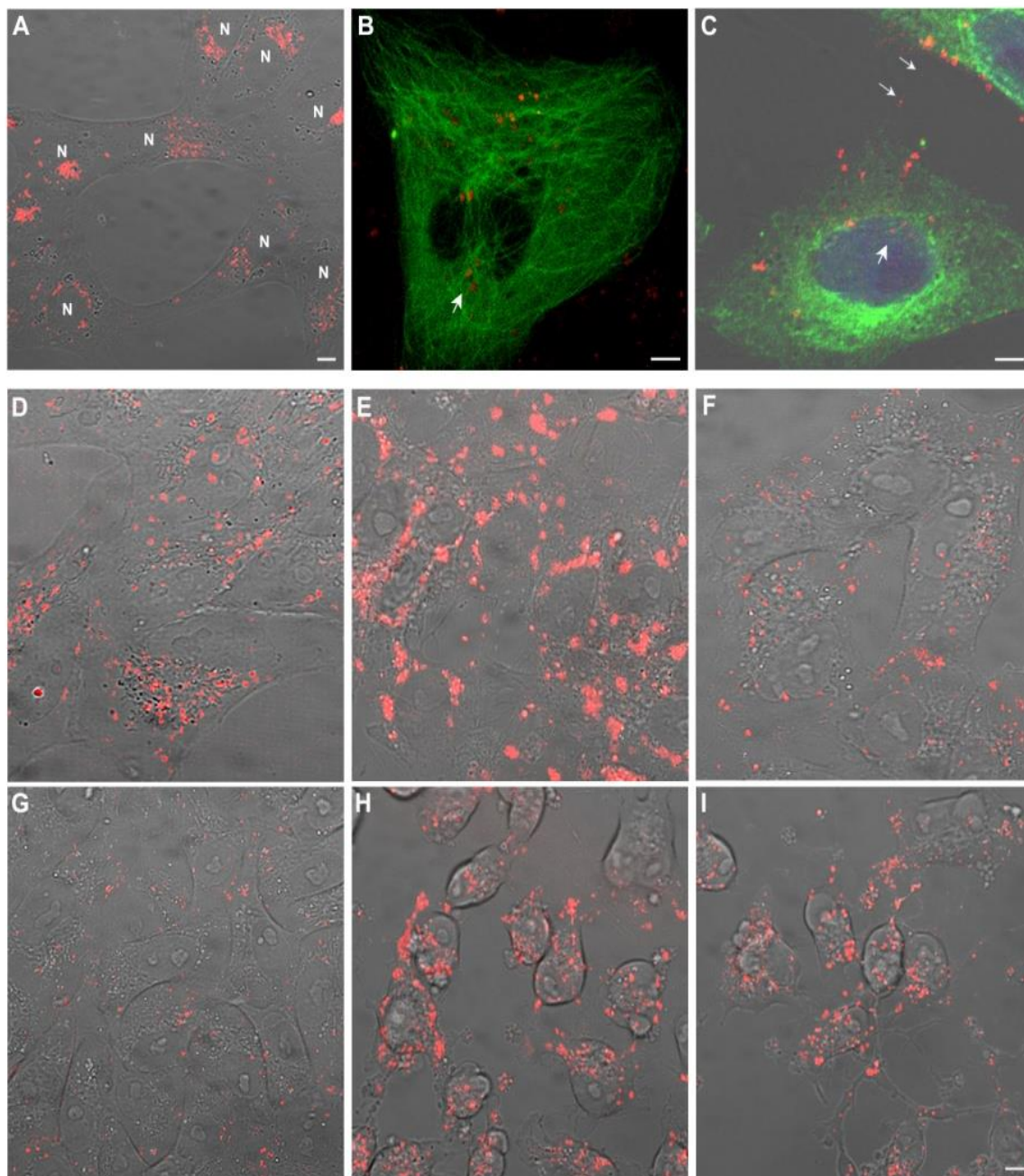
las NPs se internalizaron rápidamente hacia el núcleo y fueron dirigidas y se acumularon en la zona perinuclear (Figura 20A). Se pudo visualizar la colocalización de NPs con los microtúbulos y su movimiento a lo largo de estos, por ejemplo en células en mitosis adoptando la distribución de los microtúbulos en el huso mitótico y hacia los centrómeros (Figura 20B) y también en proyecciones celulares (Figura 20C). Este movimiento era lineal y bidireccional y además llegaba a la periferia celular y a las proyecciones o nanotubos.

#### **6.3.1. Efecto del Nocodazol en el movimiento de las nanopartículas.**

El movimiento y la dispersión de las NPs (Figura 20D) se inhibía de forma reversible por agentes despolimerizantes de microtúbulos, como el Nocodazol (Figura 20E). Una vez retirada la droga, y tras el lavado y la adición de medio nuevo (Figura 20F), el movimiento y la dispersión de NPs en el cultivo se recuperaron.

#### **6.3.2. Efecto de la Latrunculina A en el movimiento de las nanopartículas.**

Al contrario que con el Nocodazol, las drogas que despolimerizan el citoesqueleto de actina, como la Latrunculina A, no impidieron el movimiento de las NPs entre las células colapsadas por el efecto de la droga (Figura 20H). El efecto de Latrunculina A, a diferencia del Nocodazol, no era reversible mediante el lavado y cambio de medio (Figura 20I).



**Figura 20. Papel del citoesqueleto en la dispersión de NPs.** (A) Acumulación de las NPs en la zona perinuclear. (B) Progresión de las NPs hacia el MTOC, en células Vero transfectadas con GFP-tubulina, (C) en el núcleo (azul) y proyecciones (flechas) en células Vero incubadas con un anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina-FITC. (D-I) El movimiento de las NPs resultó ser sensible a la despolimerización de microtúbulos en células Vero incubadas con drogas como se muestra en (E-H) en las fases de tratamiento y posterior retirada de la droga y lavado. Las células fueron incubadas con 0.2mg/ml Au@Tio@Dynpro y posteriormente tratadas durante 1 h con (E) 2.5 $\mu$ M Nocodazol, agente despolimerizante de microtúbulos y con (H) 0,1  $\mu$ M Latrunculina A, agente despolimerizante de actina. (D, G) Distribución celular generalizada de Au@Tio@DBPs antes del tratamiento con drogas. (E) Bloqueo del transporte de NPs después de 1 h de incubación con Nocodazol, y (F) recuperación del movimiento y dispersión después del lavado. (H) Latrunculina A produjo el colapso del citoesqueleto de actina pero el transporte de NPs fue preservado dentro de las células y sus proyecciones. (I) No se observaron diferencias después del lavado. Se realizaron los experimentos A-I con las Au@DBPs de 13nm obteniendo idénticos resultados. Barra 10  $\mu$ m.

Podemos decir pues, que las nanopartículas adquieren esa capacidad de movimiento preciso y rápido gracias a la funcionalización con los DBPs que le otorgan la capacidad de unión a tubulina para poder desplazarse por el interior celular.

#### **6.4. Transporte eficiente de los DBPs y las nanopartículas Au@Tio@DBPs hacia el interior del núcleo.**

Tanto los péptidos ó DBPs y como las nanopartículas funcionalizadas con ellos, Au@Tio@DBPs, demostraron su capacidad de atravesar la envoltura nuclear, entrar en el núcleo y transportarse a través del compartimento nuclear (Figura 21) como se describirá a continuación.

##### **6.4.1. NPs dejan una huella a su entrada al núcleo.**

El tamaño de las nanopartículas era de una media de 2.8 nm de diámetro del núcleo de oro de las nanopartículas Au@tiopronina según se desprende de las imágenes del TEM. Estas nanopartículas entraban y salían fácilmente en núcleo y nucléolo. Su movimiento a través de la matriz nuclear producía una huella visible de su trayecto. Se observaba como protrusiones o relieves lineales usando microscopia de campo claro. Estas huellas en forma de gusano se observaban a medida que las nanopartículas se movían a través de la matriz nuclear y el nucléolo (Figura 21A, B, flecha).

##### **6.4.2. Plegamiento reversible de las láminas nucleares.**

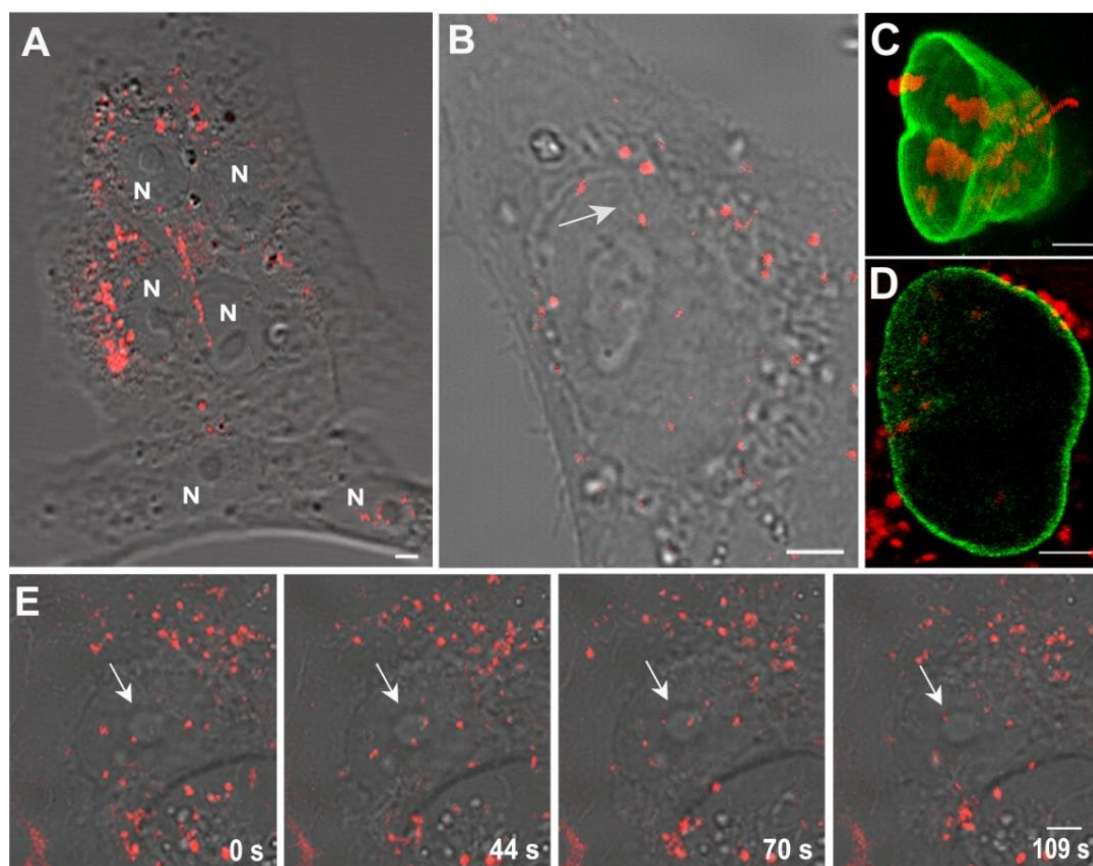
Se pudo observar como la envoltura nuclear no obstaculizaba el movimiento de las NPs. Las Au@Tio@DBPs atravesaban la envoltura nuclear y las láminas nucleares, como se muestra en células Vero transfectadas con el plásmido EGFP-LBR expresando el receptor de lámina B1 (Figura 21D) y con el EGFP Lamin B1 marcando así la lámina B1 (Figura 21C). De hecho, las Au@Tio@DBP a su paso, producían invaginaciones de la envoltura nuclear en diferentes zonas, como se muestra en las secciones ecuatoriales y las reconstrucciones en 3D (Figura 21C). Cuando un número de nanopartículas empujaba en un mismo lado, la envoltura nuclear se plegaba, siendo capaz de recuperar su forma de nuevo posteriormente.

##### **6.4.3. Similitud con las propiedades dinámicas de los DBPs.**

Además analizamos el mecanismo por el cual las nanopartículas modificadas entraban en el núcleo. De forma similar a los péptidos, Au@Tio@Dynpro también entraban en el núcleo y nucléolo (Figura 21E).

El transporte al núcleo de las nanopartículas mimetizadas con péptidos de unión a dineína, puede ser debida a la capacidad de esta proteína de desensamblar las láminas nucleares como ocurre en los estadios tempranos de la mitosis. La entrada en el núcleo ha sido descrita para diferentes mecanismos de reparto ó *delivery* que entran en el núcleo eficientemente en células en división, es decir en un momento funcional en el que ocurren reordenamientos de la envoltura nuclear para que la mitosis pueda tener lugar. Sin embargo, los péptidos con capacidad de unión a dineína podrían ser capaces de provocar esos reordenamientos en células que no están en división. Ni la viabilidad ni la proliferación celular fueron modificadas con ninguna de las formulaciones nanopartícula-péptido.

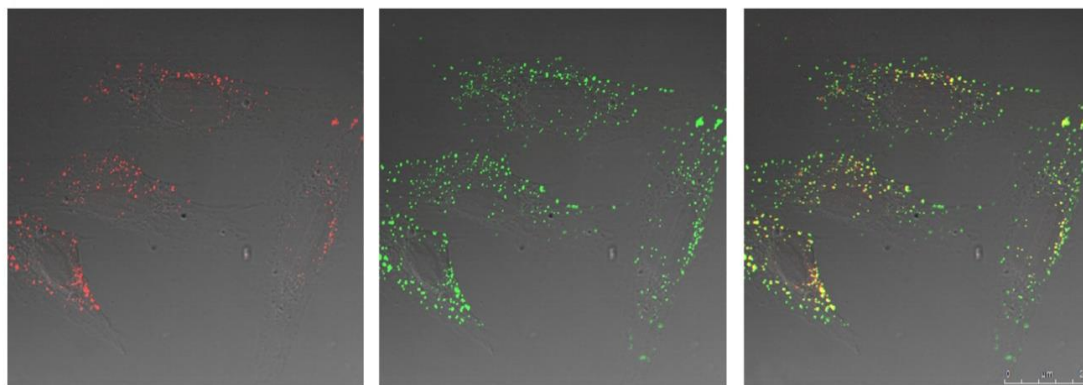
En cualquier caso, los DBPs así como las nanopartículas funcionalizadas con ellos tienen la capacidad de viajar por el interior celular, llegar a la zona perinuclear y, atravesando la barrera nuclear, penetrar en el núcleo (video 5 – anexo). Esta es una habilidad clave para hacer de estas nanopartículas unas buenas posibles candidatas para actuar como *nanocarriers* en terapia génica.



**Figura 21. Capacidad de penetración nuclear de NPs funcionalizadas.** (A) Au@Tio@DBPs acumuladas en la zona perinuclear en células Vero después de 1,5 h de incubación. (B) Protrusiones o huellas de Au@Tio@DBPs al penetrar el núcleo y por el movimiento a través de la matriz nuclear. (C) Reconstrucción tridimensional de la envoltura nuclear en que se observan (E) NPs entrando en el núcleo en células Vero transfectadas con plásmidos expresando lámina B1-GFP. (D) Au@Tio@DBPs entran y salen del núcleo en células Vero transfectadas con plásmidos expresando un receptor de lámina B-GFP. (E) Au@Tio@DBPs entrando y saliendo del nucléolo en células Vero transfectadas con plásmidos expresando B23-GFP nucleolina. Se observan imágenes a diferentes tiempos. (A-E) Estos experimentos se llevaron a cabo con las Au@DBPs de 13nm obteniéndose idénticos resultados. Barra 5  $\mu$ m.

### 6.5. Transporte de proteínas unidas a las NPs funcionalizadas.

Para comprobar la capacidad de las NPs de transporte de moléculas al interior celular, lo cual es muy relevante para sus posibles aplicaciones potenciales, se unió la proteína M2 del virus de la Influenza a NPs funcionalizadas con el péptido DynPro (Au@Tio@DynPro-M2). Después de la incubación de las NPs a una concentración de 0.2 mg/ml en células Vero durante 1 hora, la muestra se procesó por inmunofluorescencia indirecta y mediante el uso del anticuerpo Anti-M2 influenza se localizó la proteína M2 distribuida por la zona citoplásmica así como nuclear de las células y colocalizando con las NPs marcadas con TAMRA (Figura 22).



**Figura 22. Reparto de proteínas unidas a las NPs.** Au@Tio@DBPs, con la proteína M2 de Influenza unida, localizadas en zonas citoplásmicas y nucleares en células Vero después de 1h de incubación. Las células fueron fijadas a posteriori, analizadas por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti-M2 y registradas por microscopia confocal. (Rojo) Señal de TAMRA unido a las NPs, (verde) señal de la proteína M2 de Influenza mediante el uso de un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488, (amarillo) colocalización de la señal de TAMRA (NPs) y Alexa 488 (M2 Influenza). Los resultados obtenidos con las Au@DBPs de 13nm fueron idénticos observándose también transporte y distribución de la proteína unida a las NPs.

Esto demuestra que estas nanopartículas pueden ser un medio eficaz de transporte de proteínas o antígenos al interior celular, con excelente capacidad de distribución y que puede hacerlas sistemas de reparto o “delivery” extremadamente útil y eficiente de posible aplicación en el campo de las vacunas, terapia génica, etc.



## **Discusión**



## 1. LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE LOS DBPs Y SUS PROPIEDADES DINÁMICAS.

Los virus han desarrollado estrategias para secuestrar y utilizar en su provecho el transporte intracelular durante la infección. Muchos virus entran en la célula y se transportan a través de la vía endocítica para alcanzar la zona perinuclear. Aunque estos patógenos se transportan dentro de los endosomas (Gruenberg, 2009; Sieczkarski and Whittaker, 2003), algunos virus codifican proteínas que se unen directamente a los motores microtubulares para transportarse a lo largo de los microtúbulos y así alcanzar la zona perinuclear e iniciar la replicación (Alonso et al., 2001; Cohen et al., 2012; Leopold and Pfister, 2006; Sherer et al., 2007; Smith and Enquist, 2002). Este es el caso del VPPA que se sirve de la proteína p54, que es una proteína tardía localizada en la envoltura externa de los viriones, para unirse a la cadena ligera de la dineína, DYNLL1, y así transportarse a lo largo de los microtúbulos para llegar a la zona perinuclear e iniciar la replicación (Alonso et al., 2001).

Los virus han sido utilizados ampliamente en terapia génica, sobre todo adenovirus y retrovirus. En comparación a este modelo de transporte intracelular utilizado por diversos virus, existe un interés generalizado por la utilización de péptidos con capacidad de penetración celular (CPPs) que pueden penetrar en la célula actuando como dispositivos de liberación de macromoléculas. Generalmente, son péptidos cortos de menos de 20 aminoácidos y altamente enriquecidos en residuos básicos. Entre ellos, Antp, Tat-(48-60), y péptidos de oligoarginina son los más estudiados (Jiao et al., 2009; Min et al., 2010). En general, estos métodos pretenden evitar el uso de los virus completos como vectores.

En este trabajo hemos realizado un estudio sobre péptidos sintetizados a partir de la secuencia de unión a dineína de diversas proteínas que se unen a motores moleculares, entre otras, la proteína p54 del VPPA, además fusionados a un péptido de octaarginina para facilitar la penetración en la célula (Tabla 6). Uno de los hallazgos fundamentales de este trabajo ha consistido en determinar las propiedades dinámicas de estas secuencias peptídicas. Hemos demostrado que son capaces de moverse activamente en el interior celular y estas propiedades dinámicas les confieren una mayor capacidad de acumulación y dispersión intracelular en comparación con péptidos sintetizados a partir de una secuencia aleatoria sin capacidad de unión a dineína también unidos a

octaargininas que se ha utilizado como control (Figura 1). Es decir, los péptidos con capacidad de unión a dineína significativamente mejoran la acumulación intracelular en comparación a otros péptidos de penetración intracelular (CPPs) que han sido descritos hasta el momento (Bechara and Sagan, 2013). La acumulación intracelular de péptidos se midió en diferentes tipos celulares mediante el cálculo de la fluorescencia media intracelular a diferentes tiempos de incubación de los péptidos, obteniendo resultados significativamente mayores de fluorescencia intracelular en las secuencias DBPs frente al péptido control sin secuencia de unión a dineína (Figura 2). Además se comprobó que los DBPs no eran tóxicos para las células que conservaban su capacidad de división y proliferación (Figura 1 y 3). Podemos afirmar así que los DBPs se acumulan en el interior celular de forma muy rápida, observándose una eficiente distribución y transporte intracelular (video 1 – anexo). El hecho de que hayan mostrado propiedades similares en líneas celulares de diversos orígenes justifica su potencial utilización universal. En este trabajo fueron probados en células de diversos orígenes, entre ellas, células epiteliales de riñón de mono verde Africano (Vero), en células de origen fibroblástico procedentes de tejidos de riñón de mono (COS-7), en las líneas celulares renales embrionarias humanas (HEK293T), de neuroblastoma humano (SK-N-MC), en células caninas (MDCK), en células derivadas de cáncer cérvico-uterino (HeLa) y en las líneas celulares de insecto (H5 y Sf21) (Figura 4).

Por tanto, hemos demostrado que los péptidos con capacidad de unión a motores moleculares aumentan su acumulación intracelular. Nuestras observaciones apoyan la noción de que péptidos unidos al motor microtubular dineína muestran propiedades dinámicas como resultado de la flexibilidad fisiológica de esta molécula.

## **2. IMPLICACION DEL CITOESQUELETO Y ENDOCITOSIS EN EL TRANSPORTE DE LOS DBPs.**

El mecanismo de captación celular de los péptidos con capacidad de penetración celular (CPPs) es todavía controvertido. Los CPPs pueden ser endocitados vía clatrina/caveolas o por macropinocitosis pero también son posibles otras vías no endocíticas. Es generalmente aceptado, que hay una dependencia de energía en el mecanismo de internalización mediante endocitosis ya que todas las vías se inhiben a bajas temperaturas. Por consiguiente, a bajas temperaturas, la internalización de los CPPs dependería de un mecanismo de translocación directa (Jiao et al., 2009). Los péptidos

que entran por endocitosis se transportarían dentro de endosomas y después inducirían el escape endosomal (Bolhassani, 2011) (video 4 – anexo) De acuerdo con nuestros resultados, la entrada de los DBPs era inhibida a 4°C y disminuía significativamente en presencia de inhibidores de endocitosis (bafilomicina) lo cual es consistente con la entrada celular mediada por endocitosis. Además, observamos colocalización de péptidos, con marcadores de endosomas tardíos pero, por otro lado, encontramos evidencias de escape endosomal que permitiría el movimiento de los péptidos independiente de vesículas (Figura 12 y 13). La vía endocítica *per se* es fuertemente dependiente del transporte microtubular a diferentes niveles de tal modo que no son dos mecanismos independientes entre sí (Gruenberg, 2009; Huotari and Helenius, 2011). La maduración de endosomas tempranos a tardíos implica la expresión de Rab7 GTPasa en la membrana endosomal. Los endosomas tardíos que expresan Rab7 son capaces de unirse al complejo motor microtubular a través de una proteína lisosomal que interacciona con Rab7 (RILP) y una proteína de unión al oxisterol ORP1L (Rocha et al., 2009). La expresión de RILP induce el reclutamiento del complejo motor dineína-dinactina en los endosomas tardíos que contienen Rab7. Esta interacción con las proteínas motoras determina la distribución intracelular de los endosomas tardíos promoviendo el transporte de los endosomas maduros hacia la zona del MTOC (Jordens et al., 2001; Rocha et al., 2009). La habilidad de unirse ambos al complejo motor microtubular de los endosomas y los DBPs independientemente, puede explicar nuestros hallazgos de los DBPs moviéndose acompañados por endosomas tardíos a veces sin directa superposición. Un movimiento bidireccional, similar al que hemos observado en los péptidos de unión a dineína, ha sido previamente descrito para vesículas móviles se unen a dineína como los melanosomas (Gross et al., 2002) y peroxisomas (Ally et al., 2009; Kural et al., 2005). Estos presentan un movimiento bidireccional característico (Hendricks et al., 2010) y la base y el mecanismo exacto para este cambio de dirección está todavía en discusión (Ross et al., 2008). Algunos autores, consideran que corresponde al movimiento normal de la dineína en la célula y que depende de la polaridad de los microtúbulos, ya que la dineína se acumula de forma característica en los extremos de polaridad positiva (plus-ends) y sin embargo su movimiento es en dirección hacia los extremos negativos (minus-end). La dineína podría ser transportada por la quinesina hacia los plus-ends después de realizar su acción (Yamada et al., 2010). Otros señalan la posibilidad de que la dineína actúe concertadamente con la quinesina y el movimiento final sería debido al cambio

alternativo entre los dos motores en direcciones opuestas (Dodding and Way, 2011). Tanto el transporte endocítico o microtubular conduciría la acumulación del péptido hacia el MTOC en células no polarizadas como ha sido clásicamente descrito (Figura 5). Sin embargo, en células polarizadas encontramos una intensa acumulación de péptidos en haces de microtúbulos en áreas de la célula correspondientes a extensiones celulares más periféricas que no se encontraban en regiones citoplásmicas no polarizadas. La polarización de la red de microtúbulos varía considerablemente dependiendo de la región de la célula y el estadio del ciclo celular, por ejemplo en la célula en división, durante la formación del huso mitótico. Durante la mitosis, encontramos que el movimiento de los DBPs era afectado por esas variables siguiendo la polaridad de los microtúbulos. En los bordes dirigentes, en la membrana de las células sometidas a activa migración, como por ejemplo el frente de movimiento de los lamelipodios o las puntas de los filopodios, los extremos positivos de un subconjunto de microtúbulos son estabilizados y muestran un crecimiento persistente (Kirschner and Mitchison, 1986) y los DBPs se movían hacia dichas extensiones celulares y se acumulaban en esas áreas polarizadas (Diagrama 7 y video 2 - anexo).

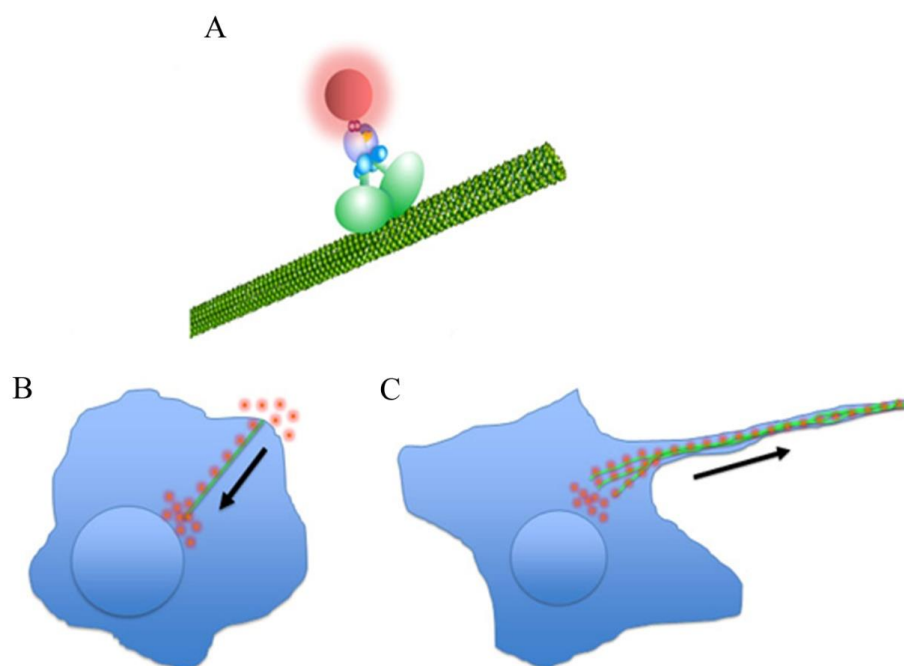
Los extremos de los microtúbulos en crecimiento sufren varios procesos de extensión (polimerización) y encogimiento dependiendo de proteínas específicas que se acumulan en los extremos positivos (Honnappa et al., 2009). En un modelo de “búsqueda y captura”, los extremos positivos exploran el entorno intracelular (Mimori-Kiyosue and Tsukita, 2003) y, como mostramos aquí, también el entorno extracelular en busca de contactos con sitios diana de contacto. Cuando los microtúbulos crecen hacia una región específica de la célula llamado sitio de captura cortical, hay un grupo de proteínas de rastreo de extremos positivos llamadas +TIPs (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Estas consisten en un grupo heterogéneo de proteínas asociadas a microtúbulos que incluyen a la dineína citoplásmica. Algunas de estas proteínas unen los microtúbulos a la corteza celular y los estabilizan (Ligon et al., 2003). Encontramos marcaje con el anticuerpo  $\alpha$ -DYNLL1 en esas zonas corticales junto con acumulación de péptidos sugiriendo que los DBPs pueden usar este mecanismo para alcanzar el córtex celular en proyecciones celulares (Figura 6) y nanotubos (Figura 7). De forma similar, la polarización de microtúbulos se produce en la sinapsis inmunológica y virológica dirigiendo la dispersión célula-célula del virus de la inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1) (Jolly et al., 2007; Shirao and Gonzalez-Billault, 2013; Stinchcombe and Griffiths, 2007). Un

mecanismo subyacente a esta polarización involucrando endosomas y microtúbulos ha sido descrito recientemente (Jolly et al., 2011). En este, el citoesqueleto de microtúbulos y de actina son dinámicamente acoplados para regular la polaridad y la movilidad celular (Gundersen, 2002; Li and Gundersen, 2008; Meiri et al., 2012).

De forma similar, las fuerzas de empuje y tracción originadas por los DBPs en sitios de captura cortical de microtúbulos y en las zonas de contacto célula-célula promovían extensiones membranosas celulares en forma de nanotubos basados en actina, que se observaban sobre todo 30 min después de la adición de los DBPs (Figuras 7 y 8). Los DBPs se dispersan rápidamente viajando de una célula a otra mediante estas proyecciones y nanotubos. Encontramos una evolución a lo largo del tiempo y en esos sitios de contacto iniciados por actina se formaban proyecciones más gruesas basadas en microtúbulos y posteriormente, esos microtúbulos eran acetilados y estabilizados de forma progresiva (Figura 7E, F). Los nanotubos fueron descritos por primera vez como estructuras tubulares para la transferencia selectiva de vesículas y orgánulos (Rustom et al., 2004). Estos nanotubos hacedores de túneles (tunneling nanotubes) consisten en extensiones citoplásmicas membranosas con actina y miosina V que son formados *de novo* para sustentar el transporte célula-célula y generar redes celulares complejas. Además, varios trabajos han mostrado que esta transmisión intercelular de componentes celulares a través de nanotubos puede estar basado en un esqueleto de microtúbulos (Onfelt et al., 2006). Algunos virus pueden controlar esta habilidad del citoesqueleto de la célula huésped para construir proyecciones celulares y así alcanzar células distantes no infectadas contribuyendo a la diseminación de los virus (Hope, 2007; La Boissiere et al., 2004). Los péptidos fluorescentes usados en el presente trabajo permitieron obtener imágenes en células vivas de transporte intracelular y han proporcionado nuevos puntos de vista sobre la formación de nanotubos que habían sido difíciles de obtener en el pasado debido a una carencia de las herramientas necesarias. En el presente trabajo de tesis, hemos mostrado como los péptidos se movían hacia la periferia celular, alcanzando el córtex celular, se transportaban hacia nanotubos y filopodios y hacia contactos célula-célula. Este movimiento implica alternativamente transporte endosomal y microtubular, junto con la dinámica del citoesqueleto de actina y tubulina en zonas de contacto célula-célula.

La participación de ambos tipos de citoesqueleto fue comprobada con el uso de inhibidores específicos de la polimerización de microtúbulos (Nocodazole y Taxol) e inhibidores de la polimerización de actina (Latrunculina A y Jasplakinolide; Figuras 9 y 10 respectivamente y video 3 - anexo).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis no han permitido postular que el péptido se incorpora al sistema de transporte intracelular como un todo, de forma similar a los patógenos intracelulares como los virus. Encontramos una acumulación marcada de DBPs en los frentes de migración y en sitios de contacto célula-célula. La dineína citoplásmica era reclutada en los sitios de contacto célula-célula y los microtúbulos se proyectaban hacia los parches de dineína como había sido descrita en otros modelos experimentales (Karki et al., 2002; Ligon and Holzbaur, 2007). Estos investigadores reportaron que la microinyección de anticuerpos anti-dineína tiene una acción disruptiva del anclaje de los microtúbulos y la formación de uniones intercelulares.



**Diagrama 7. Transporte de DBPs por los microtúbulos a través de la dineína y distribución intracelular.** (A) Péptidos de unión al motor microtubular de la dineína. (B) Célula no migratoria. Movimiento hacia el extremo negativo. (C) Célula polarizada. Movimiento hacia el frente de la proyección.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los microtúbulos polarizados inmovilizados sirven de pista para el reparto de los componentes necesarios para formar las uniones intercelulares hasta el sitio de destino que es un punto de contacto en la

periferia celular. De acuerdo con esto, hemos observado conducción de los DBPs hacia sitios de contacto célula-célula y que en células tratadas con EGTA, se producía la pérdida de la acumulación de los péptidos en áreas corticales por la disociación de las adhesiones celulares con pérdida de contactos y proyecciones. Además, observamos movimiento de los péptidos de unión a dineína dirigidos hacia las uniones intercelulares de forma preferente en las células epiteliales MDCK (Figuras 9 y 10).

Finalmente, probamos la capacidad de estas secuencias peptídicas para alcanzar la zona perinuclear y penetrar en el núcleo superando la barrera nuclear llegando incluso a alcanzar el nucléolo (figura 11). Se observó una reestructuración de la envuelta nuclear y desensamblaje de las láminas nucleares en las zonas de entrada al núcleo de los DBPs. Esta capacidad es clave en su posible uso como transportadores de moléculas al interior celular y será discutida más ampliamente más abajo.

En conclusión, el análisis del transporte celular usando DBPs en células vivas reveló la relación del transporte de dichos péptidos con la polaridad de los microtúbulos y la implicación fisiológica de la actina y de la dinámica de acoplamiento de los microtúbulos que permiten viajar de célula a célula y construir un sistema de redes de transporte estable. Estos péptidos han demostrado su utilidad como nuevas herramientas o sondas moleculares para el estudio de aspectos controvertidos de la dinámica del citoesqueleto. Finalmente, y dado que esos péptidos son de origen viral, se podría postular que la unión a dineína de algunas proteínas virales tiene un papel crucial no solo en el transporte del virus durante la infección temprana hacia el interior de la célula sino que también puede jugar un papel fundamental en otras propiedades como la dispersión del virus y su paso de una célula a otra. Además, basándonos en estas nuevas propiedades dinámicas, DBPs podrían ser considerados como candidatos para ser utilizados como portadores para la administración de drogas.

### **3. FUNCIONALIZACIÓN DE NPs DE ORO CON DBPs PARA SU POTENCIAL USO EN EL REPARTO CELULAR.**

El suministro de fármacos es el método o proceso de administración de un compuesto farmacéutico para lograr un efecto terapéutico en seres humanos o animales. Hoy en día, están ganando cada vez más importancia los nuevos sistemas de administración de

fármacos y terapia génica libres de virus. Estos nuevos sistemas ofrecen alternativas prometedoras para la liberación de drogas por vía parenteral en particular mediante el uso de péptidos y proteínas terapéuticas. Para este fin, se han formulado diversos sistemas de administración de fármacos que están siendo investigados en la actualidad. Estos incluyen liposomas, proliposomas, microesferas, geles, profármacos, ciclodextrinas (Tiwari et al., 2012), entre otros, y nanopartículas (Lopez-Cartes et al., 2005). Las nanopartículas en general cumplen con las estrictas exigencias impuestas en diferentes sistemas de suministro, tales como la capacidad para ser transferido a un aerosol, la estabilidad frente a las fuerzas generadas durante la aerosolización, la biocompatibilidad, la selección de sitios específicos o poblaciones de células diana, la liberación de los fármacos de una manera predeterminada, y su degradación en un período de tiempo aceptable (de la Fuente et al., 2006; Tiwari et al., 2012). En el caso de los usos para terapia génica, por ejemplo, la transferencia génica eficiente depende de varios factores, incluyendo la densidad de la matriz extracelular, la captación de ADN plásmido y el transporte nucleocitoplásmico eficiente. Por esta razón, es necesario un sistema que sea capaz de transportarse activamente por la célula y que a la vez proporcione una gran estabilidad a las moléculas transportadas.

Por ello, llevamos este estudio a una de sus posibles aplicaciones basada las capacidades dinámicas de los DBPs sintetizados para combinarlas con nanopartículas de oro como posibles vehículos para nanoadministración de compuestos. En este trabajo, hemos demostrado que los péptidos con capacidad de unión a dineína son útiles, conjugados a la superficie de nanopartículas modificadas para mejorar sus propiedades dinámicas (Figura 14 y 15) con un posible uso en la liberación intracelular de sustancias. En el presente trabajo de tesis, hemos demostrado que por medio de la funcionalización con péptidos de unión a dineína, las nanopartículas funcionalizadas adquieren la propiedad de moverse de forma activa en el ambiente intracelular a lo largo de las proyecciones como hemos descrito y dentro y fuera del núcleo celular (Figura 16). Hasta ahora según nuestro conocimiento, nunca se había detallado antes una eficiencia tan alta en el movimiento, dispersión y transmisión intercelular en la nanoadministración de compuestos o estructuras modificadas. Las nanopartículas son pequeñas partículas (de unos pocos a 200 nm de diámetro), que pueden servir como portadores de drogas, genes de interés y hasta agentes de contraste para la producción de imágenes en medicina. Aunque son de pequeño tamaño en comparación con las



células, las nanopartículas son mucho mayores que las moléculas y tienen menor probabilidad de atravesar las barreras intracelulares y ganar acceso a las células. Para que las drogas alcancen el núcleo como el sitio de acción (así como las hormonas, DNA plasmídico e agentes intercalantes del DNA, etc.), cruzar la membrana nuclear es una barrera para su liberación en el sitio adecuado. La captación nuclear de DNA plasmídico es el paso limitante en una transfección eficiente y una terapia génica de éxito.

El núcleo celular está separado del citosol por dos membranas las cuales están periódicamente interrumpidas por los poros nucleares, formados por grandes complejos proteicos de unos 120 MDa (Lim et al., 2008) que tienen una apariencia de cesta. Las moléculas menores de 40–45 kDa y menores de 100 nm cruzan la membrana nuclear por transporte pasivo, mientras otras moléculas interactúan con factores citosólicos para cruzar la membrana nuclear a través de los complejos de poros nucleares (Lim et al., 2008; Pante, 2004). Ciertas secuencias peptídicas, conocidas como señales de localización nuclear (NLS), mayoritariamente compuestas por aminoácidos básicos, se han descrito por interactuar específicamente con los factores citoplásmicos los cuales pueden entonces orientar moléculas hacia el núcleo (Nair et al., 2003). Diferentes aproximaciones para mediar el reparto de enzimas o ácidos nucleicos hacia el núcleo se han descrito para la terapia génica o la transfección (Branden et al., 2001; Sebestyen et al., 2007). Sin embargo, el DNA en el citoplasma es susceptible de degradación por DNAsas así como la movilidad de fragmentos mayores de DNA está restringida debido al conglomerado de sustancias y a la densidad del citosol. De forma adicional, la entrada del DNA en el núcleo todavía se basa en la ruptura de la envuelta nuclear durante la mitosis. A pesar del concepto prometedor del acoplamiento de péptidos que contengan un NLS a un plásmido o a un DNA linearizado, la transferencia de plásmidos intactos o moléculas mayores ha sido menos eficiente que el esperado (Ciolina et al., 1999). Trabajos recientes sugieren que algunos tumores presentan defectos genéticos en la maquinaria nuclear de exportación con una asociada retención de miRNAs dentro del núcleo que dañaría severamente una efectiva producción del gen de interés administrado (Melo et al., 2010).

La dineína, como se ha explicado anteriormente, es una proteína del complejo motor microtubular, la cual está compuesta de cadenas pesadas, intermedias y ligeras. Las dos

últimas son responsables de la unión y transporte de un amplio rango de cargas. De hecho, la dineína es responsable de la posición del núcleo en la célula, de la reposición del aparato de Golgi después de la mitosis celular, dando la idea de capacidad de esta molécula para transportar orgánulos de gran tamaño. La dineína tiene un papel central en la formación del huso mitótico durante la mitosis e interacciona dinámicamente con la envuelta nuclear direccionando el ensamblaje y reensamblaje de las láminas nucleares de dicha envuelta. Así pues, los péptidos que unen dineína son capaces de aprovechar esas propiedades y dominar la permeabilidad del compartimento nuclear, como hemos demostrado anteriormente, facilitando así la entrada y transporte a través de la célula de las nanopartículas que a su vez proporcionan una mayor estabilidad para el reparto intracelular de sustancias.

En este trabajo, se utilizaron nanopartículas de oro de dos tamaños diferentes (Au@Tio@DBPs de 2 nm y Au14@DBPs de 14 nm, llamadas en general NPs) sintetizadas por el método Berry y funcionalizadas con los DBPs (Figura 14 y 15). Nuestro estudio demostró que dichas NPs tienen una gran capacidad de las para internalizarse en diferentes tipos celulares. En este caso, se utilizaron la línea celular de neuroblastoma SK-N-MC, la línea celular epitelial MDCK, una línea derivada de un carcinoma epitelial HeLa y la línea celular 293T que es una línea celular embrionaria transformada de riñón humano (Figura 16). La acumulación intracelular de las NPs alcanzaba su máximo a los 120 min de incubación. Las Au@Tio@DBPs y Au14@DBPs fueron comparadas con NPs funcionalizadas con un péptido sin capacidad de unión a dineína (Au@Tio@IntCt y Au14@IntCt respectivamente) y pudimos demostrar la mayor capacidad de internalización y acumulación intracelular que el dominio de unión a la dineína confiere a las NPs (Figura 16 y 17).

#### **4. TRANSPORTE INTRA E INTERCELULAR DE NPs.**

Para el uso de NPs como posible transportadoras de moléculas es imprescindible que las NPs sean capaces de superar las barreras intracelulares y así poder moverse por el interior celular para su completa distribución como se ha mencionado anteriormente. Hemos mostrado en resultados como las Au@Tio@DBPs y Au14@DBPs son capaces de moverse por el interior celular mediante su interacción con el citoesqueleto y sin alterar la biología celular (figura 18). La progresión de estas NPs tanto en el área citoplásmica como en la perinuclear seguía trayectorias lineales permitiendo su rápido

avance a una velocidad de 0.4  $\mu\text{m/s}$  y resultaba en una progresiva distribución a lo largo del citoplasma celular alcanzando la zona nuclear. Al contrario que estas, las Au@Tio@IntCt no presentaban un movimiento lineal o progresivo sino más bien aleatorio presentando así una velocidad de distribución menor de 0.2  $\mu\text{m/s}$  mostrando una baja eficiencia como posibles transportadores de moléculas (Figura 19). Además, pudimos observar las NPs en la zona perinuclear colocalizando con microtúbulos así como en proyecciones celulares para su posible distribución intercelular. La dependencia del transporte de las NPs de los microtúbulos celulares se hizo más evidente al usar inhibidores específicos. Utilizamos Nocodazol para inhibir la polimerización de microtúbulos y así inhibir el transporte de partículas asociados a ellos y en efecto, este inhibidor producía pérdida del movimiento de las nanopartículas que permanecieron inmóviles y agregadas. Como es un inhibidor reversible, el lavado de la muestra y la eliminación del inhibidor hacía que las NPs recuperasen el movimiento y la dispersión inicial. Por otro lado se utilizó un inhibidor de la actina, la Latrunculina A, que al producir el colapso del citoesqueleto de actina resultaba en una pérdida de la morfología normal de las células, pero no una pérdida del movimiento. Estos resultados con los inhibidores demuestran que el movimiento intracelular de las NPs está asociado al citoesqueleto de microtúbulos y no al de actina. Si bien la presencia de nanotubos o proyecciones intercelulares finas de actina se inhibían permaneciendo exclusivamente el movimiento intercelular a través de las conexiones principales entre células (Figura 20).

Por lo tanto, observamos formación de nanotubos en lugares de acumulación de péptido en la corteza celular y transporte de los péptidos de célula a célula. Estos nanotubos evolucionaban de forma temporal iniciándose como finas proyecciones con esqueleto de actina. Posteriormente aparecían nanotubos más anchos con esqueleto de tubulina (microtúbulos) que eran progresivamente acetilados para formar conexiones celulares estables.

## 5. ENTRADA NUCLEO DE DBPs Y NPs

Una de las cualidades esenciales de un transportador intracelular de moléculas para su posible uso en la nanoadministración es que sea capaz de atravesar la envuelta nuclear que actúa como barrera para la entrada en el núcleo. Para multiplicarse con éxito, los virus deben inyectar su genoma en las células huésped y explotar la maquinaria celular

para su replicación. Por lo tanto un paso clave para una eficaz infección viral es la liberación nuclear del genoma (Mudhakar and Harashima, 2009). Varios tipos virales exhiben procesos de interacción con la envuelta nuclear para facilitar la salida del núcleo después de la replicación viral (Cibulka et al., 2012). Por ejemplo en el caso del virus del herpes, las nucleocápsidas recién formadas dejan el núcleo por gemación con la membrana nuclear interna, adquiriendo así una envoltente primaria que se funde posteriormente con la membrana nuclear externa para continuar con su maduración en el citosol (Mettenleiter et al., 2013). Este transporte a través de las membranas nucleares mediado por una estructura vesicular es único en biología celular. Otro ejemplo sería el citomegalovirus humano (HCMV) en el cual la salida de las cápsidas desde el núcleo se produce a través de los poros nucleares dilatados o a través de la remodelación de la envoltura nuclear por un proceso designado pseudomitosis (Alwine, 2012). En el caso de los parvovirus se pone en peligro la integridad de la envoltura nuclear mediante el secuestro de la caspasa-3 que produce una disolución local de las láminas nucleares, creando por lo tanto huecos por los que cápsidas obtienen acceso al núcleo durante la entrada. Este tipo de proceso también se produce con el VIH (Grimm et al., 2012). El VPPA se replica principalmente en el citoplasma perinuclear, en zonas llamadas factorías virales, a pesar de que algunas primeras fases replicativas ocurren en el núcleo. La interacción de VPPA con el motor microtubular mediante la proteína p54 a través de la cadena ligera de la dineína es una estrategia viral para garantizar un transporte eficiente del virus hasta el núcleo y la sucesiva replicación perinuclear. En este caso, se podría plantear la posibilidad de que el virus interactúe con la envuelta nuclear a través de la interacción de la p54 con la dineína citoplasmática y así poder penetrar en el núcleo celular para iniciar su proceso replicativo que más tarde continuará en el MTOC.

De forma similar demostramos que los DBPs así como las NPs funcionalizadas con los DBPs serían capaces de llegar al núcleo mediante el transporte a través de microtúbulos y una vez allí, superar las barreras nucleares penetrando en el interior nuclear (figura 21). Esto es esencial para su posible uso en terapia génica en la cual se intentan transportar e insertar secuencias de ADN o de ARN al interior de células diana, con objeto de alterar la expresión de determinadas proteínas que se encuentran dañadas. El éxito de la terapia génica es en gran medida dependiente del desarrollo de un vector o vehículo que pueda administrar un gen en las células diana de forma selectiva y eficiente con una cantidad mínima de toxicidad. Los virus son eficientes en la

transducción de las células. Sin embargo, las preocupaciones de seguridad sobre su uso en humanos hacen de los sistemas de reparto no virales una alternativa más segura. Los vectores libres de virus de cualquier origen son particularmente apropiados debido a su sencillez de uso, su facilidad de producción a gran escala y la ausencia de respuesta inmune específica asociada a ellos (Li and Huang, 2000).

En nuestro estudio, hemos demostrado la capacidad de penetración nuclear de DBPs y NPs funcionalizadas y hemos observado una eficiente acumulación de ambos en la zona perinuclear y su posterior paso y transporte al núcleo. Las NPs al penetrar el núcleo y al moverse a través de la zona nuclear y por su gran tamaño dejan unos rastros en la matriz nuclear (*tracks*) son evidentes en el campo claro del confocal. Asimismo, se observan discontinuidades y pliegues en la membrana nuclear en las zonas en que los DBPs o las NPs entran y salen del núcleo. Mediante reconstrucciones tridimensionales de la envoltura nuclear hemos observado tanto DBPs como NPs entrando en el núcleo y produciendo dichos repliegues de la lámina nuclear en los sitios de entrada. Además los DBPs y las NPs tienen la capacidad de entrar en el núcleo y posteriormente salir para volver a la zona citoplásmica de nuevo. Esto tiene mucha importancia ya que su acúmulo permanente en el interior nuclear podría resultar tóxico para las células. La capacidad de atravesar la envoltura nuclear es una característica de la dineína. El inicio de la mitosis está marcado por la migración del centrosoma para la formación del huso mitótico que requiere dineína. Además, la acción de la dineína sobre los microtúbulos conduce a la reorganización de la envoltura nuclear en la mitosis temprana (Beaudouin et al., 2002; Salina et al., 2002). La pérdida de la compartimentalización nuclear inducida por la ruptura de la envoltura nuclear se caracteriza por el aumento de la permeabilidad junto con la iniciación del desmontaje del poro nuclear (Kutay and Hetzer, 2008). Así pues, esta molécula tiene la capacidad de conducir el desmontaje de la envoltura nuclear y permeabilizar esta capa. Por lo tanto, las nanopartículas funcionalizadas con péptidos de unión a dineína probablemente toman ventaja de las propiedades de esta molécula.

Por lo tanto, los DBPs como las NPs tienen la capacidad de alcanzar el nucléolo mostrando también la capacidad de entrada y posterior salida. Comprobamos que las NPs debido a la funcionalización con los DBPs han adquirido la habilidad de transportarse eficientemente a través de los microtúbulos celulares para llegar al núcleo,

superar las barreras nucleares para penetrar en él, incluso llegar a alcanzar el nucléolo y finalmente volver a salir. Esto completa las características de las NPs como posibles transportadores para la nanoadministración de moléculas con fines terapéuticos (video 5 – anexo).

## **6. NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON DBPs SON BUENAS CANDIDATAS PARA LA LIBERACIÓN INTRACELULAR DE SUSTANCIAS.**

Las nanopartículas de oro han surgido como vehículo prometedor para la entrega de moléculas en su destino celular. En vista de sus propiedades fisicoquímicas y ópticas, han sido explotadas para formación de imágenes multimodalidad, posible tratamiento de tumores, y como transportador de agentes terapéuticos diferentes (Akhter et al., 2012). Una de las características fundamentales que deben tener las NPs para ser buenas candidatas como transportadores o *carriers* es poder transportar las molécula de interés a todos los compartimentos de la célula. En este trabajo hemos demostrado que estas NPs no solo tienen la capacidad de penetrar en la célula sino de distribuirse ampliamente por toda la zona citoplásmica y, superando todas las barreras alcanzar el núcleo celular. Además, su eficaz dispersión con gran eficacia en las células del cultivo a través de las uniones célula-célula, permite una distribución optimizada de las mismas. En este trabajo se ha comprobado la capacidad de transporte de macromoléculas de las NPs de oro funcionalizadas con DBPs uniendo una proteína a dichas NPs para comprobar si estas podrían hacerla penetrar y distribuirla en la célula. La proteína M2 de Influenza fue elegida como ejemplo para su unión a las NPs por su interés en la síntesis de vacunas. Tras la incubación de las NPs cargadoras de la proteína M2 pudimos comprobar cómo las NPs eran capaces no solo de introducirse en las células con toda facilidad sino también distribuirse a través del citosol y zona nuclear (figura 22). Esto quiere decir que las NPs generan un entorno estable para el mantenimiento de la molécula a transportar mientras a su vez son capaces de transportarla eficientemente al interior celular. La rápida dispersión de estas nanopartículas funcionalizadas de célula en célula que además permanece de forma intracelular, reduciendo la exposición tanto de la carga transportada como de la nanopartícula al compartimento extracelular minimizando pérdidas eventuales. La capacidad de las nanopartículas propulsadas por un motor de entrar y salir del núcleo podría superar las limitaciones presentes de la terapia génica para alcanzar este compartimento celular aislado. Esas características,

junto con su capacidad de acumulación intracelular permitirían a su vez reducciones en las dosis administradas de una droga determinada debido a su mejor biodisponibilidad en una gran variedad de aplicaciones, pudiendo hacer de estas nanopartículas unos buenos candidatos como portadores para la liberación de fármacos.

## **CONCLUSIONES**



1. Se han diseñado y sintetizado secuencias peptídicas que se unen a la proteína motora celular dineína, derivadas de secuencias víricas (Virus de la Peste Porcina Africana y del virus de la Rabia), y de origen celular (Miosina V).
2. Los péptidos de unión a dineína caracterizados se transportan siguiendo un movimiento intracelular bidireccional dependiente de la polarización de los microtúbulos y a través de proyecciones intercelulares. Sus propiedades derivan de la flexibilidad fisiológica de este motor molecular.
3. Debido a sus propiedades dinámicas, estos péptidos son potencialmente útiles como sondas moleculares para el análisis del movimiento intracelular ligado al citoesqueleto y para el estudio de la biogénesis de nanotubos.
4. Estudios llevados a cabo con estos péptidos sugieren un mecanismo de formación de nanotubos que implica tanto actina como tubulina, siendo necesarias las fuerzas dinámicas que se generan por acción cooperativa de ambas con la dineína en microtúbulos polarizados y su captura cortical.
5. Los péptidos demostraron la capacidad de remodelar y atravesar la envuelta nuclear de una forma similar a la descrita para la dineína al comienzo de la mitosis celular. Esta propiedad plantea su uso potencial en terapia génica sin necesidad de utilizar virus completos como vectores, sino estas secuencias de origen viral. Nanopartículas de oro funcionalizadas con secuencias peptídicas de unión a dineína presentaron propiedades dinámicas similares a las que se observaron con los péptidos aisladamente, transportándose a través del citosol y con la capacidad de atravesar la envuelta nuclear. Además, de acumularse eficientemente en las células, son capaces de dispersarse rápidamente en cultivo a través de proyecciones celulares.
6. Las propiedades observadas en estas nanopartículas funcionalizadas hacen que tengan posibles aplicaciones que incluyen la terapia génica y el suministro intracelular de sustancias alcanzando todos los compartimentos intracelulares.



## **BIBLIOGRAFÍA**

- Akhmanova, A., and M.O. Steinmetz. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:309-322.
- Akhter, S., M.Z. Ahmad, F.J. Ahmad, G. Storm, and R.J. Kok. 2012. Gold nanoparticles in theranostic oncology: current state-of-the-art. *Expert opinion on drug delivery*. 9:1225-1243.
- Alonso, C., J. Miskin, B. Hernaez, P. Fernandez-Zapatero, L. Soto, C. Canto, I. Rodriguez-Crespo, L. Dixon, and J.M. Escribano. 2001. African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *Journal of virology*. 75:9819-9827.
- Alwine, J.C. 2012. The human cytomegalovirus assembly compartment: a masterpiece of viral manipulation of cellular processes that facilitates assembly and egress. *PLoS pathogens*. 8:e1002878.
- Allan, V. 1996. Motor proteins: a dynamic duo. *Current biology : CB*. 6:630-633.
- Ally, S., A.G. Larson, K. Barlan, S.E. Rice, and V.I. Gelfand. 2009. Opposite-polarity motors activate one another to trigger cargo transport in live cells. *The Journal of cell biology*. 187:1071-1082.
- Bareford, L.M., and P.W. Swaan. 2007. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 59:748-758.
- Barua, S., and K. Rege. 2010. The influence of mediators of intracellular trafficking on transgene expression efficacy of polymer-plasmid DNA complexes. *Biomaterials*. 31:5894-5902.
- Beaudouin, J., D. Gerlich, N. Daigle, R. Eils, and J. Ellenberg. 2002. Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell*. 108:83-96.
- Bechara, C., and S. Sagan. 2013. Cell-penetrating peptides: 20years later, where do we stand? *FEBS letters*.
- Bolhassani, A. 2011. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 1816:232-246.
- Branden, L.J., B. Christensson, and C.I. Smith. 2001. In vivo nuclear delivery of oligonucleotides via hybridizing bifunctional peptides. *Gene therapy*. 8:84-87.
- Bukoreshtliev, N.V., X. Wang, E. Hodneland, S. Gurke, J.F. Barroso, and H.H. Gerdes. 2009. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS letters*. 583:1481-1488.
- Carter, A.P. 2013. Crystal clear insights into how the dynein motor moves. *Journal of cell science*. 126:705-713.
- Cibulka, J., M. Fraiberk, and J. Forstova. 2012. Nuclear actin and lamins in viral infections. *Viruses*. 4:325-347.
- Ciolina, C., G. Byk, F. Blanche, V. Thuillier, D. Scherman, and P. Wils. 1999. Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha. *Bioconjugate chemistry*. 10:49-55.
- Cohen, S., I. Etingov, and N. Pante. 2012. Effect of viral infection on the nuclear envelope and nuclear pore complex. *International review of cell and molecular biology*. 299:117-159.
- Conway, L., D. Wood, E. Tuzel, and J.L. Ross. 2012. Motor transport of self-assembled cargos in crowded environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:20814-20819.
- Cuesta-Geijo, M.A., I. Galindo, B. Hernaez, J.I. Quetglas, I. Dalmau-Mena, and C. Alonso. 2012. Endosomal maturation, Rab7 GTPase and phosphoinositides in African swine fever virus entry. *PLoS one*. 7:e48853.
- Charlton, C.A., and L.E. Volkman. 1993. Penetration of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology*. 197:245-254.

- Chen, P., W. Hubner, M.A. Spinelli, and B.K. Chen. 2007. Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *Journal of virology*. 81:12582-12595.
- Cho, C., and R.D. Vale. 2012. The mechanism of dynein motility: insight from crystal structures of the motor domain. *Biochimica et biophysica acta*. 1823:182-191.
- Dauty, E., and A.S. Verkman. 2005. Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm: a new barrier for non-viral gene delivery. *The Journal of biological chemistry*. 280:7823-7828.
- Davis, D.M., and S. Sowinski. 2008. Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:431-436.
- de la Fuente, J.M., and C.C. Berry. 2005. Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconjugate chemistry*. 16:1176-1180.
- de la Fuente, J.M., C.C. Berry, M.O. Riehle, and A.S. Curtis. 2006. Nanoparticle targeting at cells. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 22:3286-3293.
- Delorme-Axford, E., and C.B. Coyne. 2011. The actin cytoskeleton as a barrier to virus infection of polarized epithelial cells. *Viruses*. 3:2462-2477.
- Dodding, M.P., and M. Way. 2011. Coupling viruses to dynein and kinesin-1. *The EMBO journal*. 30:3527-3539.
- Dohner, K., C.H. Nagel, and B. Sodeik. 2005. Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol*. 13:320-327.
- Dohner, K., and B. Sodeik. 2005. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 285:67-108.
- dos Santos, T., J. Varela, I. Lynch, A. Salvati, and K.A. Dawson. 2011. Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines. *PloS one*. 6:e24438.
- Dujardin, D.L., L.E. Barnhart, S.A. Stehman, E.R. Gomes, G.G. Gundersen, and R.B. Vallee. 2003. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *The Journal of cell biology*. 163:1205-1211.
- Dustin, M.L., A.K. Chakraborty, and A.S. Shaw. 2010. Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a002311.
- Faix, J., and R. Grosse. 2006. Staying in shape with formins. *Developmental cell*. 10:693-706.
- Falanga, A., M.T. Vitiello, M. Cantisani, R. Tarallo, D. Guarnieri, E. Mignogna, P. Netti, C. Pedone, M. Galdiero, and S. Galdiero. 2011. A peptide derived from herpes simplex virus type 1 glycoprotein H: membrane translocation and applications to the delivery of quantum dots. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 7:925-934.
- Favoreel, H.W., G. Van Minnebruggen, D. Adriaensen, and H.J. Nauwynck. 2005. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:8990-8995.
- Gomez-Villamandos, J.C., F.J. Salguero, E. Ruiz-Villamor, P.J. Sanchez-Cordon, M.J. Bautista, and M.A. Sierra. 2003. Classical Swine Fever: pathology of bone marrow. *Vet Pathol*. 40:157-163.
- Gomez, T.S., and D.D. Billadeau. 2008. T cell activation and the cytoskeleton: you can't have one without the other. *Advances in immunology*. 97:1-64.
- Gousset, K., E. Schiff, C. Langevin, Z. Marijanovic, A. Caputo, D.T. Browman, N. Chenouard, F. de Chaumont, A. Martino, J. Enninga, J.C. Olivo-Marin, D. Mannel, and C. Zurzolo. 2009. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol*. 11:328-336.
- Granadillo, M., M.G. Vallespi, A. Batte, O. Mendoza, Y. Soria, V.M. Lugo, and I. Torrens. 2011. A novel fusion protein-based vaccine comprising a cell penetrating and

- immunostimulatory peptide linked to human papillomavirus (HPV) type 16 E7 antigen generates potent immunologic and anti-tumor responses in mice. *Vaccine*. 29:920-930.
- Grimm, K.S., B.G. Klupp, H. Granzow, F.M. Muller, W. Fuchs, and T.C. Mettenleiter. 2012. Analysis of viral and cellular factors influencing herpesvirus-induced nuclear envelope breakdown. *Journal of virology*. 86:6512-6521.
- Gross, S.P., M.C. Tuma, S.W. Deacon, A.S. Serpinskaya, A.R. Reilein, and V.I. Gelfand. 2002. Interactions and regulation of molecular motors in *Xenopus melanophores*. *The Journal of cell biology*. 156:855-865.
- Gruenberg, J. 2009. Viruses and endosome membrane dynamics. *Current opinion in cell biology*. 21:582-588.
- Gundersen, G.G. 2002. Microtubule capture: IQGAP and CLIP-170 expand the repertoire. *Current biology : CB*. 12:R645-647.
- Hendricks, A.G., E. Perlson, J.L. Ross, H.W. Schroeder, 3rd, M. Tokito, and E.L. Holzbaur. 2010. Motor coordination via a tug-of-war mechanism drives bidirectional vesicle transport. *Current biology : CB*. 20:697-702.
- Hendricks, A.G., A.E. Twelvetrees, and E.L. Holzbaur. 2012. Intracellular transport: new tools provide insights into multi-motor transport. *Current biology : CB*. 22:R1053-1055.
- Hernaez, B., and C. Alonso. 2010. Dynamin- and clathrin-dependent endocytosis in African swine fever virus entry. *Journal of virology*. 84:2100-2109.
- Hernaez, B., J.M. Escibano, and C. Alonso. 2008. African swine fever virus protein p30 interaction with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) during infection. *FEBS letters*. 582:3275-3280.
- Hernaez, B., T. Tarrago, E. Giralt, J.M. Escibano, and C. Alonso. 2010. Small peptide inhibitors disrupt a high-affinity interaction between cytoplasmic dynein and a viral cargo protein. *Journal of virology*. 84:10792-10801.
- Hesse, W.R., M. Steiner, M.L. Wohlever, R.D. Kamm, W. Hwang, and M.J. Lang. 2013. Modular aspects of Kinesin force generation machinery. *Biophysical journal*. 104:1969-1978.
- Hoefen, R.J., and B.C. Berk. 2006. The multifunctional GIT family of proteins. *Journal of cell science*. 119:1469-1475.
- Honnappa, S., S.M. Gouveia, A. Weisbrich, F.F. Damberger, N.S. Bhavesh, H. Jawhari, I. Grigoriev, F.J. van Rijssel, R.M. Buey, A. Lawera, I. Jelesarov, F.K. Winkler, K. Wuthrich, A. Akhmanova, and M.O. Steinmetz. 2009. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell*. 138:366-376.
- Hook, P., and R.B. Vallee. 2006. The dynein family at a glance. *Journal of cell science*. 119:4369-4371.
- Hope, T.J. 2007. Bridging efficient viral infection. *Nat Cell Biol*. 9:243-244.
- Huotari, J., and A. Helenius. 2011. Endosome maturation. *The EMBO journal*. 30:3481-3500.
- Huse, M. 2012. Microtubule-organizing center polarity and the immunological synapse: protein kinase C and beyond. *Frontiers in immunology*. 3:235.
- Jiao, C.Y., D. Delaroche, F. Burlina, I.D. Alves, G. Chassaing, and S. Sagan. 2009. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *The Journal of biological chemistry*. 284:33957-33965.
- Jolly, C., I. Mitar, and Q.J. Sattentau. 2007. Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*. 81:5547-5560.
- Jolly, C., S. Welsch, S. Michor, and Q.J. Sattentau. 2011. The regulated secretory pathway in CD4(+) T cells contributes to human immunodeficiency virus type-1 cell-to-cell spread at the virological synapse. *PLoS pathogens*. 7:e1002226.
- Jordens, I., M. Fernandez-Borja, M. Marsman, S. Dusseljee, L. Janssen, J. Calafat, H. Janssen, R. Wubbolts, and J. Neefjes. 2001. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Current biology : CB*. 11:1680-1685.

- Kardon, J.R., and R.D. Vale. 2009. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:854-865.
- Karki, S., and E.L. Holzbaur. 1999. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Current opinion in cell biology*. 11:45-53.
- Karki, S., L.A. Ligon, J. DeSantis, M. Tokito, and E.L. Holzbaur. 2002. PLAC-24 is a cytoplasmic dynein-binding protein that is recruited to sites of cell-cell contact. *Mol Biol Cell*. 13:1722-1734.
- Kelkar, S.A., K.K. Pfister, R.G. Crystal, and P.L. Leopold. 2004. Cytoplasmic dynein mediates adenovirus binding to microtubules. *Journal of virology*. 78:10122-10132.
- Kim, S., and P.A. Coulombe. 2007. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev*. 21:1581-1597.
- Kirschner, M., and T. Mitchison. 1986. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell*. 45:329-342.
- Knipe, D.M., and A. Cliffe. 2008. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol*. 6:211-221.
- Krendel, M., and M.S. Mooseker. 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)*. 20:239-251.
- Kural, C., H. Kim, S. Syed, G. Goshima, V.I. Gelfand, and P.R. Selvin. 2005. Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement? *Science*. 308:1469-1472.
- Kutay, U., and M.W. Hetzer. 2008. Reorganization of the nuclear envelope during open mitosis. *Current opinion in cell biology*. 20:669-677.
- La Boissiere, S., A. Izeta, S. Malcomber, and P. O'Hare. 2004. Compartmentalization of VP16 in cells infected with recombinant herpes simplex virus expressing VP16-green fluorescent protein fusion proteins. *Journal of virology*. 78:8002-8014.
- Langworthy, M.M., and B. Appel. 2012. Schwann cell myelination requires Dynein function. *Neural development*. 7:37.
- Lanier, L.M., and L.E. Volkman. 1998. Actin binding and nucleation by Autographa californica M nucleopolyhedrovirus. *Virology*. 243:167-177.
- Larsen, J., I. Grigoriev, A. Akhmanova, and L.B. Pedersen. 2013. Analysis of microtubule plus-end-tracking proteins in cilia. *Methods in enzymology*. 524:105-122.
- Leopold, P.L., and K.K. Pfister. 2006. Viral strategies for intracellular trafficking: motors and microtubules. *Traffic*. 7:516-523.
- Li, R., and G.G. Gundersen. 2008. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:860-873.
- Li, S., and L. Huang. 2000. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene therapy*. 7:31-34.
- Ligon, L.A., and E.L. Holzbaur. 2007. Microtubules tethered at epithelial cell junctions by dynein facilitate efficient junction assembly. *Traffic*. 8:808-819.
- Ligon, L.A., S.S. Shelly, M. Tokito, and E.L. Holzbaur. 2003. The microtubule plus-end proteins EB1 and dynactin have differential effects on microtubule polymerization. *Mol Biol Cell*. 14:1405-1417.
- Lim, R.Y., K.S. Ullman, and B. Fahrenkrog. 2008. Biology and biophysics of the nuclear pore complex and its components. *International review of cell and molecular biology*. 267:299-342.
- Lopez-Cartes, C., T.C. Rojas, R. Litran, D. Martinez-Martinez, J.M. de la Fuente, S. Penades, and A. Fernandez. 2005. Gold nanoparticles with different capping systems: an electronic and structural XAS analysis. *The journal of physical chemistry. B*. 109:8761-8766.
- Luby-Phelps, K. 2000. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol*. 192:189-221.
- Marsh, M., and R. Bron. 1997. SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface. *Journal of cell science*. 110 ( Pt 1):95-103.

- Martin, M.E., and K.G. Rice. 2007. Peptide-guided gene delivery. *The AAPS journal*. 9:E18-29.
- Martinez-Moreno, M., I. Navarro-Lerida, F. Roncal, J.P. Albar, C. Alonso, F. Gavilanes, and I. Rodriguez-Crespo. 2003. Recognition of novel viral sequences that associate with the dynein light chain LC8 identified through a pepscan technique. *FEBS letters*. 544:262-267.
- Matthews, J.D., R. Morgan, C. Sleighter, and T.K. Frey. 2013. Do viruses require the cytoskeleton? *Virology journal*. 10:121.
- Mattila, P.K., and P. Lappalainen. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:446-454.
- Meiri, D., C.B. Marshall, M.A. Greeve, B. Kim, M. Balan, F. Suarez, C. Bakal, C. Wu, J. Larose, N. Fine, M. Ikura, and R. Rottapel. 2012. Mechanistic insight into the microtubule and actin cytoskeleton coupling through dynein-dependent RhoGEF inhibition. *Molecular cell*. 45:642-655.
- Melo, S.A., C. Moutinho, S. Ropero, G.A. Calin, S. Rossi, R. Spizzo, A.F. Fernandez, V. Davalos, A. Villanueva, G. Montoya, H. Yamamoto, S. Schwartz, Jr., and M. Esteller. 2010. A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer cell*. 18:303-315.
- Mettenleiter, T.C., F. Muller, H. Granzow, and B.G. Klupp. 2013. The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. *Cellular microbiology*. 15:170-178.
- Mimori-Kiyosue, Y., and S. Tsukita. 2003. "Search-and-capture" of microtubules through plus-end-binding proteins (+TIPs). *J Biochem*. 134:321-326.
- Min, S.H., D.M. Kim, M.N. Kim, J. Ge, D.C. Lee, I.Y. Park, K.C. Park, J.S. Hwang, C.W. Cho, and Y.I. Yeom. 2010. Gene delivery using a derivative of the protein transduction domain peptide, K-Antp. *Biomaterials*. 31:1858-1864.
- Moros, M., B. Hernaez, E. Garet, J.T. Dias, B. Saez, V. Grazu, A. Gonzalez-Fernandez, C. Alonso, and J.M. de la Fuente. 2012. Monosaccharides versus PEG-functionalized NPs: influence in the cellular uptake. *ACS nano*. 6:1565-1577.
- Mudhakir, D., and H. Harashima. 2009. Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus. *The AAPS journal*. 11:65-77.
- Nair, R., P. Carter, and B. Rost. 2003. NLSdb: database of nuclear localization signals. *Nucleic acids research*. 31:397-399.
- Neilan, J.G., L. Zsak, Z. Lu, T.G. Burrage, G.F. Kutish, and D.L. Rock. 2004. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*. 319:337-342.
- Ng, C.P., T.T. Goodman, I.K. Park, and S.H. Pun. 2009. Bio-mimetic surface engineering of plasmid-loaded nanoparticles for active intracellular trafficking by actin comet-tail motility. *Biomaterials*. 30:951-958.
- Onfelt, B., S. Nedvetzki, R.K. Benninger, M.A. Purbhoo, S. Sowinski, A.N. Hume, M.C. Seabra, M.A. Neil, P.M. French, and D.M. Davis. 2006. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol*. 177:8476-8483.
- Pante, N. 2004. Nuclear pore complex structure: unplugged and dynamic pores. *Developmental cell*. 7:780-781.
- Pelaz, B., G. Charron, C. Pfeiffer, Y. Zhao, J.M. de la Fuente, X.J. Liang, W.J. Parak, and P. Del Pino. 2013. Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: anticipating adverse nano-bio interactions. *Small*. 9:1573-1584.
- Perpina Tordera, M., and A. Lloris Bayo. 2004. [Bronchodilators, those marvelous drugs]. *Archivos de bronconeumologia*. 40 Suppl 1:16-22.
- Pfister, K.K., E.M. Fisher, I.R. Gibbons, T.S. Hays, E.L. Holzbaur, J.R. McIntosh, M.E. Porter, T.A. Schroer, K.T. Vaughan, G.B. Witman, S.M. King, and R.B. Vallee. 2005. Cytoplasmic dynein nomenclature. *The Journal of cell biology*. 171:411-413.



- Pichon, C., L. Billiet, and P. Midoux. 2010. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Current opinion in biotechnology*. 21:640-645.
- Plowright, W., J. Parker, and M.A. Peirce. 1969. African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, murray) collected from animal burrows in Tanzania. *Nature*. 221:1071-1073.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-465.
- Raaijmakers, J.A., M.E. Tanenbaum, and R.H. Medema. 2013. Systematic dissection of dynein regulators in mitosis. *The Journal of cell biology*. 201:201-215.
- Radtke, K., K. Dohner, and B. Sodeik. 2006. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cellular microbiology*. 8:387-400.
- Ramirez-Weber, F.A., and T.B. Kornberg. 1999. Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell*. 97:599-607.
- Raux, H., A. Flamand, and D. Blondel. 2000. Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain. *Journal of virology*. 74:10212-10216.
- Rocha, N., C. Kuijl, R. van der Kant, L. Janssen, D. Houben, H. Janssen, W. Zwart, and J. Neefjes. 2009. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *The Journal of cell biology*. 185:1209-1225.
- Ross, J.L., H. Shuman, E.L. Holzbaur, and Y.E. Goldman. 2008. Kinesin and dynein-dynactin at intersecting microtubules: motor density affects dynein function. *Biophysical journal*. 94:3115-3125.
- Ruenaroengsak, P., and A.T. Florence. 2010. Biphasic interactions between a cationic dendrimer and actin. *J Drug Target*. 18:803-811.
- Rustom, A., R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, and H.H. Gerdes. 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 303:1007-1010.
- Salina, D., K. Bodoor, D.M. Eckley, T.A. Schroer, J.B. Rattner, and B. Burke. 2002. Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell*. 108:97-107.
- Scott, G., S. Leopardi, S. Printup, and B.C. Madden. 2002. Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *Journal of cell science*. 115:1441-1451.
- Scherer, J., and R.B. Vallee. 2011. Adenovirus recruits dynein by an evolutionary novel mechanism involving direct binding to pH-primed hexon. *Viruses*. 3:1417-1431.
- Schroer, T.A. 2004. Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:759-779.
- Sebestyen, Z., J. de Vrij, M. Magnusson, R. Debets, and R. Willemsen. 2007. An oncolytic adenovirus redirected with a tumor-specific T-cell receptor. *Cancer research*. 67:11309-11316.
- Sheetz, M.P., J.E. Sable, and H.G. Dobereiner. 2006. Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 35:417-434.
- Shekhar, N., J. Wu, R.B. Dickinson, and T.P. Lele. 2013. Cytoplasmic dynein: tension generation on microtubules and the nucleus. *Cellular and molecular bioengineering*. 6:74-81.
- Sherer, N.M., M.J. Lehmann, L.F. Jimenez-Soto, C. Horensavitz, M. Pypaert, and W. Mothes. 2007. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat Cell Biol*. 9:310-315.
- Shirao, T., and C. Gonzalez-Billault. 2013. Actin filaments and microtubules in dendritic spines. *Journal of neurochemistry*.
- Sieczkarski, S.B., and G.R. Whittaker. 2003. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic*. 4:333-343.
- Sieczkarski, S.B., and G.R. Whittaker. 2005. Viral entry. *Curr Top Microbiol Immunol*. 285:1-23.
- Siglin, A.E., S. Sun, J.K. Moore, S. Tan, M. Poenie, J.D. Lear, T. Polenova, J.A. Cooper, and J.C. Williams. 2013. Dynein and dynactin leverage their bivalent character to form a high-affinity interaction. *PLoS one*. 8:e59453.

- Sloan, R.D., B.D. Kuhl, T. Mesplede, J. Munch, D.A. Donahue, and M.A. Wainberg. 2013. Productive entry of HIV-1 during cell-to-cell transmission via dynamin-dependent endocytosis. *Journal of virology*.
- Smith, G.A., and L.W. Enquist. 2002. Break ins and break outs: viral interactions with the cytoskeleton of Mammalian cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 18:135-161.
- Sowinski, S., C. Jolly, O. Berninghausen, M.A. Purbhoo, A. Chauveau, K. Kohler, S. Oddos, P. Eissmann, F.M. Brodsky, C. Hopkins, B. Onfelt, Q. Sattentau, and D.M. Davis. 2008. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol*. 10:211-219.
- Stinchcombe, J.C., and G.M. Griffiths. 2007. Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23:495-517.
- Suhail, Y., Kshitiz, J. Lee, M. Walker, D.H. Kim, M.D. Brennan, J.S. Bader, and A. Levchenko. 2013. Modeling Intercellular Transfer of Biomolecules Through Tunneling Nanotubes. *Bulletin of mathematical biology*.
- Symens, N., R. Walczak, J. Demeester, I. Mattaj, S.C. De Smedt, and K. Remaut. 2011. Nuclear inclusion of nontargeted and chromatin-targeted polystyrene beads and plasmid DNA containing nanoparticles. *Molecular pharmaceuticals*. 8:1757-1766.
- Tao, Y., and X.F. Ren. 2013. [Cell autophagy and virus infection]. *Bing du xue bao = Chinese journal of virology / [bian ji, Bing du xue bao bian ji wei yuan hui]*. 29:76-84.
- Templeton, A.C., W.P. Wuelfing, and R.W. Murray. 2000. Monolayer-protected cluster molecules. *Accounts of chemical research*. 33:27-36.
- Thomson, G.R. 1985. The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa. *Onderstepoort J Vet Res*. 52:201-209.
- Tiwari, G., R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, and S.K. Bannerjee. 2012. Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation*. 2:2-11.
- Vale, R.D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*. 112:467-480.
- Vallee, R.B., J.C. Williams, D. Varma, and L.E. Barnhart. 2004. Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol*. 58:189-200.
- van Loo, N.D., E. Fortunati, E. Ehlert, M. Rabelink, F. Grosveld, and B.J. Scholte. 2001. Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *Journal of virology*. 75:961-970.
- Verkman, A.S. 2002. Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends Biochem Sci*. 27:27-33.
- Watanabe, T., J. Noritake, and K. Kaibuchi. 2005. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol*. 15:76-83.
- Williams, G.S., L.M. Collinson, J. Brzostek, P. Eissmann, C.R. Almeida, F.E. McCann, D. Burshtyn, and D.M. Davis. 2007. Membranous structures transfer cell surface proteins across NK cell immune synapses. *Traffic*. 8:1190-1204.
- Winder, S.J., and K.R. Ayscough. 2005. Actin-binding proteins. *Journal of cell science*. 118:651-654.
- Wu, X., A. Kodama, and E. Fuchs. 2008. ACF7 regulates cytoskeletal-focal adhesion dynamics and migration and has ATPase activity. *Cell*. 135:137-148.
- Xiao, P.J., and R.J. Samulski. 2012. Cytoplasmic trafficking, endosomal escape, and perinuclear accumulation of adeno-associated virus type 2 particles are facilitated by microtubule network. *Journal of virology*. 86:10462-10473.
- Yamada, M., S. Toba, T. Takitoh, Y. Yoshida, D. Mori, T. Nakamura, A.H. Iwane, T. Yanagida, H. Imai, L.Y. Yu-Lee, T. Schroer, A. Wynshaw-Boris, and S. Hirotsune. 2010. mNUDC is required for plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1. *The EMBO journal*. 29:517-531.

- Yang, S., F.K. Huang, J. Huang, S. Chen, J. Jakoncic, A. Leo-Macias, R. Diaz-Avalos, L. Chen, J.J. Zhang, and X.Y. Huang. 2013. Molecular mechanism of fascin function in filopodial formation. *The Journal of biological chemistry*. 288:274-284.
- Yazdani, U., and J.R. Terman. 2006. The semaphorins. *Genome Biol.* 7:211.
- Yildiz, A., and P.R. Selvin. 2005. Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends Cell Biol.* 15:112-120.
- Zhou, H., S. Wu, J.Y. Joo, S. Zhu, D.W. Han, T. Lin, S. Trauger, G. Bien, S. Yao, Y. Zhu, G. Siuzdak, H.R. Scholer, L. Duan, and S. Ding. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 4:381-384.

#### Libros y links:

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, JD. 1994. 3<sup>o</sup> edición. *Molecular Biology of the Cell. Intermediate Filaments*. New York: Garland Science. (Consultado el 12 Marzo 2013).
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2006. *Introducción a la Biología Celular*. Capítulo 17: El Citoesqueleto, p. 583. 2<sup>o</sup> edición. Madrid: Médica Panamericana. (Consultado el 12 Marzo 2013).
- Consejería de Educacion de la Comunidad de Madrid. IES Rayuela. 2005. Citologia. [ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org](http://ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org). (Consultado el 10 Marzo 2013)
- Department of Energy Genome Program-wikipedia. 2007. Systems Biology. La dineina. <http://genomics.energy.gov>. (Consultado el 10 de Marzo 2013)
- Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. 2005. *Biología Celular y Molecular*. Capítulo 20: Microtúbulos, p834. 5<sup>o</sup> edición, Madrid: Medica Panamericana. (Consultado el 9 Marzo 2013).
- Paniagua, R. 2007. *Biología Celular*. Chapter 6, Citoesqueleto. 5<sup>o</sup> edición. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. (Consultado el 9 Febrero 2013).